

博士論文（要約）

放線菌におけるアミノ基キャリアタンパク質を介して
生合成される新規天然化合物の探索・発見と
その特異な N-N 結合の形成機構に関する研究

東京大学大学院 農学生命科学研究科
応用生命工学専攻 平成 26 年度進学

松田 研一

指導教員 西山 真 教授

目次

第1章 序論

1-1 緒言.....	3
1-2 キャリアタンパク質を介する生合成経路.....	7
1-3 分子内窒素-窒素(N-N)結合を有する天然化合物.....	20
1-4 本研究の目的.....	26
1-5 本論文の構成.....	27

第2章 インターネット公表できないため削除

第3章

3-1 背景と目的.....	29
3-2 方法.....	30
3-3 結果.....	38
3-4 考察.....	53

第4章 インターネット公表できないため削除

第5章 インターネット公表できないため削除

参考文献.....	61
-----------	----

謝辞.....	69
---------	----

第1章 序論

1-1 緒言

有史以来、人類は世界各地でそれぞれの経験に基づいて草根木皮に含まれる天然化合物を病気の治療に利用してきた(1,2)。1928年に世界初の抗細菌物質 **Penicillin** が **A. Fleming** によってカビから発見され、また1944年に結核の特効薬 **Streptomycin** が **S. Waksman** によって放線菌から単離されたことを契機に、感染症の治療法は、副作用の多いサルファ剤など有機合成品を使った化学療法から、病原菌を特異的に攻撃する抗生物質療法に大きく変化した(3,4)。これに引き続き、土壌微生物を主とした有用天然化合物の探索が広く行われた結果、1940年代から60年代にかけて多様な抗生物質が次々に発見され、新規抗生物質発見の黄金時代を築いた。これにより人類の平均寿命は1950年代から60年代にかけて大幅に上昇した。しかし抗生物質の使用は大多数の病原菌を死滅させる一方で、それらに感受性を示さないメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (**MRSA**) に代表される耐性菌の出現を招くこととなった。このため、新規な作用機序をもつ新しい抗生物質の継続的な発見と開発が求められているが、黄金時代以降、生物活性を指標とした探索により発見される天然化合物の多様性は頭打ちとなっており、1980年代に **Lipopeptide** が発見されたのを最後に、新規クラスの抗生物質は現在に至るまで発見されていない(5) (図1-1)。

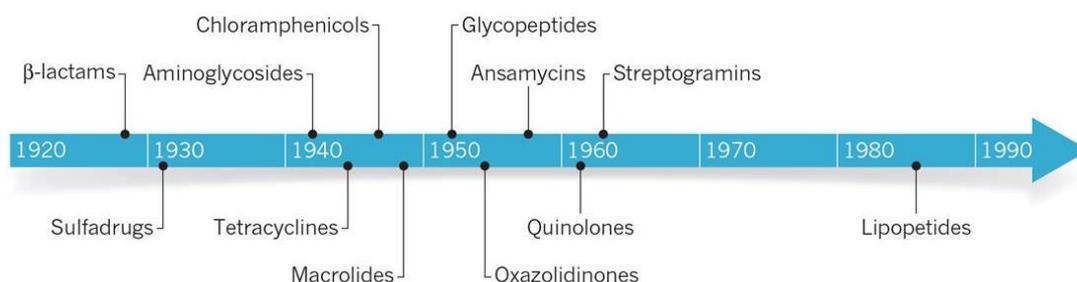


図 1-1 新規クラス抗生物質発見の年表

一方で近年のゲノムデータの蓄積により、薬物標的となりうる候補分子の情報は増加しており、それらを分子標的とした低分子のコンビナトリアルライブラリーのハイスループットスクリーニングが行われてきた。しかし類似の化学構造を多く含む合成化合物の巨大ライブラリーから薬物として実用化されたものはなく、かつての天然化合物に匹敵する有用化合物のソースとはなっていないというのが現状である(6)。このため現在ではライブラリーの化合物数よりも多

様性が重要視される傾向があり、ヘテロ原子や不斉中心を多く含む“天然化合物の特徴”を取り入れたライブラリーの構築が指向されている(7,8)。また合成化合物の抗生物質としての利用が困難な理由の一つとして、*in vitro*において特定の標的に作用する低分子を発見しても、それが実際に生きた病原菌の細胞内に取り込まれないことが挙げられる(5)。これらの状況に加え、以下に述べるような近年の塩基配列解読や各種検出機器の大幅な技術革新があり、昨今、多種多様な生理作用を有し他種生物との相互作用が期待される天然物は再び有用化合物のソースとして見直されつつある。

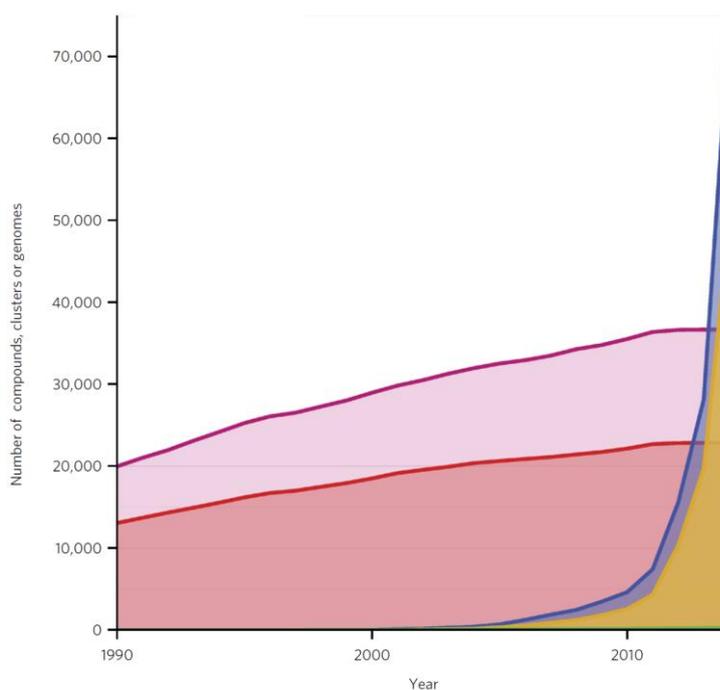
放線菌は多様な二次代謝物を産生することが知られており、さまざまな生理活性を有する化合物が発見され医薬として利用されてきた。世界最大を誇る我が国の天然化合物ライブラリーでは30万化合物のうち約6割が放線菌に由来するものである。また大村智博士は放線菌から多数の有用天然化合物を発見し、2015年には抗寄生虫活性物質 *avermectin* を発見した功績でノーベル生理学・医学賞を受賞したことは記憶に新しい。

2002年には放線菌では初めて *Streptomyces coelicolor* A3(2)ゲノムの全塩基配列が決定された(9)。その結果、通常の実験室での培養条件で生産される1,2種類の天然化合物のほかにも、抗生物質様の天然化合物の生合成に関わると思われる機能未知の遺伝子クラスターがゲノム中から25~30個も見いだされた。またDNAマイクロアレイを用いた *S. coelicolor* A3(2)のトランスクリプトーム解析により、これらの遺伝子クラスターの大部分は通常の培養条件で非常に低いレベルではあるが転写されていることがわかり、実際に天然化合物の生合成遺伝子クラスターとして機能していることが示唆された(10)。これらのことから、従来の生物活性を指標にした天然物スクリーニングでは、放線菌の有する化合物生産能の1割程度しか探索されておらず、放線菌は依然として多様な天然化合物を生産する潜在能力を有した未開拓の天然物リソースであることが明らかとなった。

またメタゲノムシーケンス解析により、現在までに培養方法の確立されていなかった難培養性微生物にも多大な二次代謝産物の生合成能が存在することが明らかになり、天然化合物の新たなリソースとして注目されている(11)。例えば、数多くの生物活性物質の単離源である *Theonella* 属の海綿から難培養性の共生細菌 *Entotheonella* 属が発見され、海綿由来の生物活性物質の多くの真の生産者であることが明らかにされている(12)。

2000年代初期からのゲノム解読技術の発展により、2010年以降、難培養性のものを含めた微生物のゲノム情報は対数的に増加しており、それに伴い生合成遺伝子クラスターの情報も飛躍的に蓄積している(図1-2)。現在ではこのビッグデータを活用して新規性の高い骨格を有した天然化合物を網羅的かつ効率的に

発見する試みが数多くなされている(13)。これらは主に、コンピューターアルゴリズムを用いて大量の遺伝子クラスター情報から新規性の低い化合物を生合成する遺伝子クラスターを排除し、新規性の高い遺伝子クラスターをさらなる検証の対象として優先的に絞り込むことを目的としている。Doroghazi らは 1 万個以上の遺伝子クラスターのネットワーク解析により、新規性の高い化合物を生合成すると思われる遺伝子クラスターを抽出している(14)。また Dejong らは既知化合物の構造から生合成遺伝子クラスターを予想するアルゴリズムを用いて、データベースの遺伝子クラスター情報と比較することにより、新規性の低い(既知)化合物と新規性の高い化合物の生合成遺伝子クラスターを区別することを試みている(ref)(15)。しかし、これらの解析手法は大量の情報を網羅的に処理できる反面、いずれも既知の生合成マシナリー(Type I PKS, Type II PKS, NRPS, NRPS-independent siderophore, lantipeptide や thiazole-oxazole modified microcin)を指標としてゲノム情報から遺伝子クラスターを抽出していることから、今まで知られていない全く新しい機構によって生合成される化合物群の多くを見逃している可能性が高い。従って、既存のものとは異なる新たな生合成マシナリーを発見し、それを指標とした探索を行うことは、上述のアルゴリズムを利用した手法では到達できない領域の天然化合物の多様性を開拓する上で非常に重要であるといえる。



Dejong, CA. Polyketide and nonribosomal peptide retrobiosynthesis and global gene cluster matching. *Nat. Chem. Biol.* 12, 1007–1014 (2016).

図 1-2 1990 年から 2015 年までの間における細菌由来の天然化合物の発見数と

解読されたゲノム情報量の推移

紫) 細菌由来の天然化合物数。赤) Dejong らの研究グループによって開発された、構造から生合成遺伝子クラスターを予測するアルゴリズム(GRAPE)にて解析可能な天然物数。黄色) NCBI データベースに登録された 100 kb 以上の塩基配列の数。青) これら塩基配列から生合成遺伝子クラスター予想アルゴリズム(PRISM)を用いて抽出された生合成遺伝子クラスターの数。緑) 生合成遺伝子クラスターが明らかとなっている天然化合物の数。

1-2 キャリアタンパク質を介する生合成経路

1-2-1 キャリアタンパク質の機能

天然化合物の生合成を含む生体内の複雑な代謝経路の多くはキャリアタンパク質を介して成立している。キャリアタンパク質とは生合成中間体を共有結合し、対応する複数の酵素の活性中心へ運搬するタンパク質である。キャリアタンパク質は、それ自体は触媒活性を有さないものの、それを介する代謝経路において中心的な役割を担っており、数々の重要な生体反応に用いられている。本節で述べるキャリアタンパク質の構造を図 1-3 に示す。一般にキャリアタンパク質は 100 残基以下のアミノ酸から構成される小タンパク質であり、対応する酵素とのタンパク質間相互作用を担う球状ドメインと生合成中間体を結合するアーム領域から成る。アーム領域は振り子のように動き、対応する各酵素の活性中心に基質を効率的に運搬する重要な働きをしている。

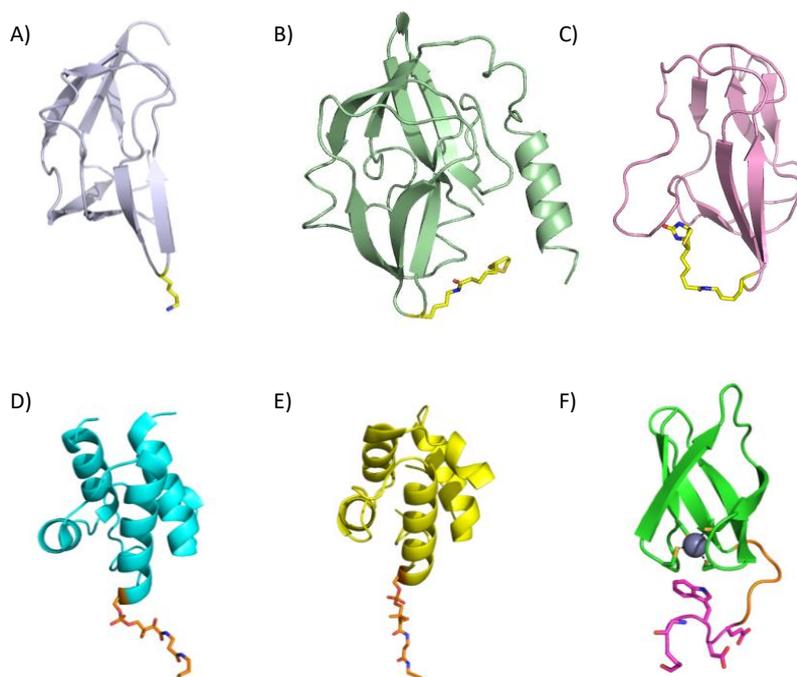


図 1-3 キャリアタンパク質の構造

A) *Bacillus stearothermophilus* 由来 PDH 複合体の lipoyl ドメイン(PDB; 1LAB)。α-リポ酸が結合するリジン残基を黄色で示した。B) *Pisum sativum* 由来グリシン開裂系の H タンパク質(PDB; 1HPC)。α-リポ酸及びそれが結合するリジン残基を黄色で示した。C) *Escherichia coli* 由来アセチル CoA カルボキシラーゼの BCCP (PDB; 1BDO)。ピオチン及びそれが結合するリジン残基を黄色で示した。D) *E. coli* 由来 FAS ACP (PDB; 4KEH)。E) *Pseudomonas aeruginosa* 由来 PA1221 の PCP ドメイン(PDB; 4DG9)。D)、E)では 4'-

て ATP 依存的にキャリアタンパク質の保存されたリジン残基にビオチンが共有結合する。B) 2-オキソ酸デヒドロゲナーゼ複合体やグリシン開裂系におけるリポ酸依存性キャリアタンパク質の翻訳後修飾。BCCP においてビオチンが結合するリジン残基に Lipoate ligase によって ATP 依存的にリポ酸が結合する。C) 脂肪酸合成や二次代謝に関わる A/PCP の翻訳後修飾。PPTase によって CoA から 4'-PP 基が A/PCP の保存されたセリン残基に転移される。

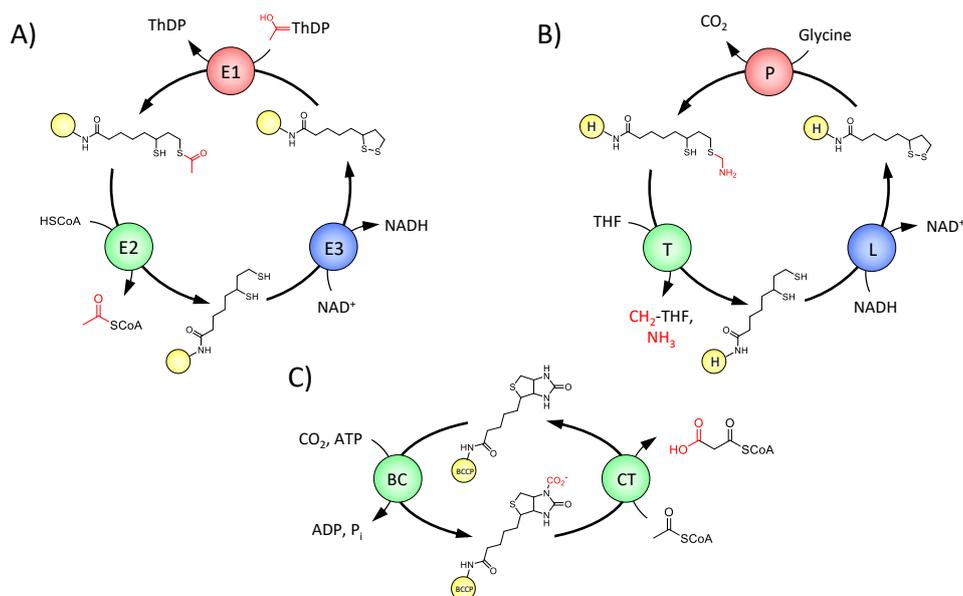


図 1-5 PF00364 のキャリアタンパク質を介する反応経路

A) 2-オキソ酸デヒドロゲナーゼ複合体の一つであるピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体におけるキャリアタンパク質の反応経路を示した。ピルビン酸の脱炭酸によって生じる酢酸を赤で示した。またチアミンリノ酸を ThDP と略記した。B) グリシン開裂システムにおけるキャリアタンパク質の反応経路を示した。グリシンの脱炭酸によって生じたメチルアミンを赤で示した。C) ビオチン依存性カルボキシラーゼの一つであるアセチル CoA カルボキシラーゼにおけるキャリアタンパク質の反応経路を示した。BCCP によって運搬される炭酸を赤で示した。

4'-ホスホパンテテイン(4'-PP)を補因子として利用するキャリアタンパク質はアシルキャリアタンパク質(ACP)やペプチジルキャリアタンパク質(PCP)が知られており、複雑かつ多様な代謝経路に用いられている(16)。ACP は主要一次代謝経路である脂肪酸合成系(FAS)や、ポリケチド合成酵素(PKS)などの二次代謝経路において脂肪酸やケト酸の運搬体として機能する。ACP は相互作用する各酵素ドメインが一つのポリペプチドとして連結した Type I システムの一部に組み込まれているもの(Type I ACP)と、各酵素が個別のポリペプチドとして独

立した Type II システムで機能するもの(Type II ACP)が知られている。
 Type I FAS における ACP はフレキシブルなリンカー領域につながれており、
 巨大酵素内の各ドメインと相互作用することができる。これにより、結合した
 生合成中間体の炭素鎖伸長と還元が繰り返され、脂肪酸が成熟する(図 1-6A)。
 一方で Type II ACP は Type I ACP のようなリンカー領域は有さず、相互作用す
 る酵素群から独立している。また Type II ACP のタンパク質表面は酸性アミノ
 酸残基により負に帯電している一方、対応する各酵素の活性中心付近は正に帯
 電しており、これらタンパク質間の静電相互作用が示唆されている。加えて Type
 II ACP は結合した疎水性の高い生合成中間体を内部の疎水的なポケットに収納
 し、外部環境から隔離することが知られている(図 1-6B)(17)。これにより生合成
 中間体と 4'-PP 基のチオエステル結合が保護されるとともに、生合成中間体が安
 定化されると考えられている。これは相互作用する各タンパク質が常に近傍に
 存在することが保証されている Type I ACP には見られない特徴である。

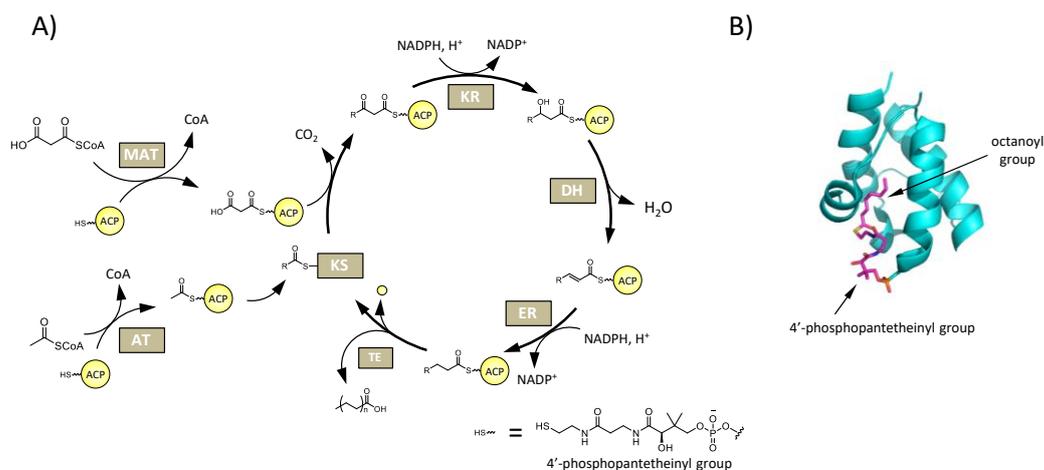


図 1-6 ACP を介した脂肪酸合成

A) ACP を介した脂肪酸合成経路の概略図。ACP と相互作用する各酵素ドメインを以下のように略記した : AT, acyltransferase; MAT, malonyl CoA transferase; KS, keto synthase; KR, keto reductase; DH, dehydratase; ER, enoyl CoA reductase; TE, thioesterase
 B) *Streptomyces coelicolor* の FAS におけるオクタン酸を結合した Type II ACP の構造 (PDB; 2KOS)。ACP をシアン、4'-PP 基とそれに結合したオクタン酸をマゼンタで示した。結合したオクタン酸が ACP 内部の疎水性の高いポケットに収納されている。

erythromycin 生合成を行う DEBS に代表される Type I PKS では Type I FAS とは異なり、ポリペプチド内に複数の ACP が存在し、生合成中間体が上流の ACP から下流の ACP に受け渡されながら修飾を受けて成熟する(図 1-7A)。各 ACP に伸長ユニットがロードされたのち、上流で生合成されたポリケタイド鎖と脱炭酸を伴いながら縮合し、同一モジュール内の各ドメインによる修飾反応と受けて下流へと受け渡される。actinorhodin 生合成に代表される Type II PKS では Type II FAS と同様にして各ドメインは独立した酵素としてコードされており、ACP がこれらと繰り返し相互作用することでポリケタイド鎖が合成される。しかし FAS とは異なりポリケタイド鎖は必ずしも完全に還元されずにケト基が残り、全長が合成されたのちに環化反応が起こる。ACP は合成途中のポリケトン鎖と相互作用し、安定化する機能を有すると考えられている(18)。

PCP は非リボソームペプチド合成酵素(NRPS)における合成途中のペプチド鎖の運搬を行う。NRPS は Type I PKS と同様に複数ドメインからなる巨大酵素であり、PCP は 1 アミノ酸ユニットの伸長を担う各モジュールに一つずつ存在する。adenylation ドメインが対応する PCP の 4'-PP 基のチオールにアミノ酸をロードしたのち、condensation ドメインによって上流のモジュールの PCP に結合している中間体ペプチド鎖と縮合されペプチド鎖が伸長する(図 1-7B)。

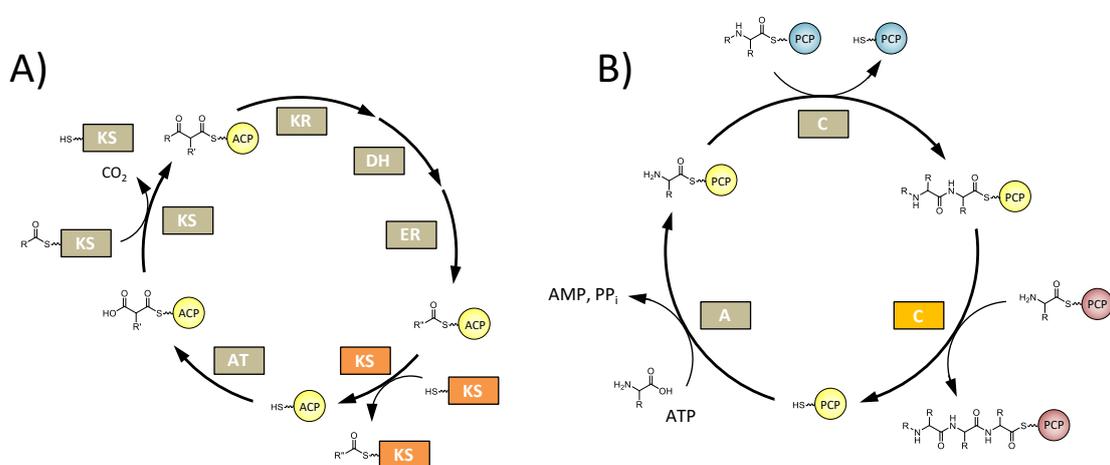


図 1-7 二次代謝における A/PCP を介する Type I システムの反応経路の概略図
およびモジュール構造

A) PKS における ACP を介した反応経路。各酵素ドメインの略記は図に従った。ACP に結合した代謝中間体はモジュール内の各ドメインに運搬されて修飾されたのち、次のモジュールの KS ドメインに転移される。B) NRPS における PCP を介した反応経路。PCP と相互作用する各酵素ドメインを以下のように略記した：A; adenylation domain, C; condensation domain。A, C ドメインによって PCP へのアミノ酸のロードと縮合が繰り返され、ペプチド鎖が伸長する。異なるモジュールの PCP は色分けして示した。

以上のような生合成経路においてキャリアタンパク質は、生合成中間体を結合して拡散を防ぎ、目的の修飾反応を特異的に行うための足場として機能している。この点においてキャリアタンパク質は化学合成における固相合成法のレジジンと同様の働きをしているといえる。しかしキャリアタンパク質はそれのみならず、結合した生合成中間体を安定化する機能を有するものもあり、遊離の形では自発的に変換してしまう不安定な中間体を経る複雑な生合成経路を形成する上で必要不可欠な要素である。

1-2-2 高度好熱菌 *Thermus thermophilus* の特異なりジン生合成における新規キャリアタンパク質 LysW の発見

リジンはヒトや動物にとって、外部から取り込まなくてはならない必須アミノ酸のひとつである。一方、細菌や植物はアスパラギン酸を初発物質として、細胞壁の構成物質であるジアミノピメリン酸(DAP)を経由する DAP 経路によってリジンを生合成している(19,20) (図 1-8)また、カビや酵母は 2-オキソグルタル酸(2-OG)から α -アミノアジピン酸(AAA)を経由し、サッカロピン(saccharopine)を経る AAA 経路によってリジンを生合成している(21-23)。

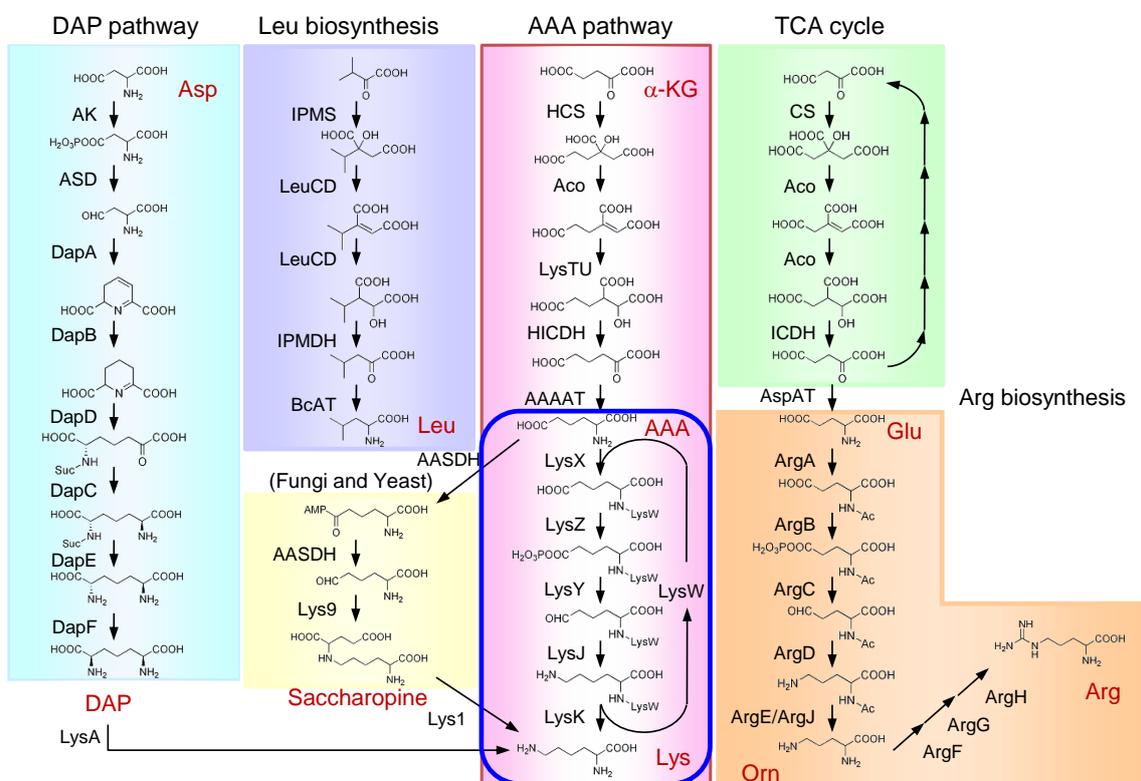


図 1-8 多様なりジン生合成経路及び一部酵素が類似している他の代謝経路

DAP 経路の初発酵素である Aspartate kinase (AK) と Aspartate semialdehyde dehydrogenase (ASADH) による反応はスレオニンやメチオニン、イソロイシンの生合成においても共通して使われており、AK は最終産物であるこれらのアミノ酸によってフィードバック阻害を受ける。しかし、高度好熱菌である *T. thermophilus* の AK はスレオニンによってのみ阻害を受けることがわかり、リジンの生合成には異なる生合成経路を用いていることが示唆された(24,25)。ニトロソグアニジン(NTG)を用いたランダム変異導入とそれに続くスクリーニングにより得られた *T. thermophilus* のリジン要求性変異株の解析により *T. thermophilus* は新規な AAA 経路によってリジンを生合成していることが明らかになった(26)。

この新規な経路の前半(2-OG から AAA までの変換)はカビや酵母の AAA 経路と同様な変換が行われ、各酵素は TCA 回路やロイシン生合成経路の一部と相同性を示すが、その後の AAA からリジンまでの変換はアルギニン、オルニチン生合成に関わる酵素 ArgB, ArgC, ArgD, ArgE と相同性の高い LysZ, LysY, LysJ, LysK によって行われることが当研究室のこれまでの研究により明らかにされた(27-32)。アルギニンの生合成において、ArgA は基質となるグルタミン酸の α -アミノ基をアセチル化し、その後続く ArgB, ArgC, ArgD による反応から α -アミノ基を保護する。これと同様に *T. thermophilus* の新規 AAA 経路においても AAA の α -アミノ基がアセチル化によって保護されることが考えられたが、AAA 以降の反応の初発酵素と予想された LysX は ArgA と相同性を示さず、機能がわかっている酵素の中では carboxylate-amine/thiol ligase superfamily に属する RimK(ribosomal protein S6 modification protein)と最も高い相同性を有していた(33)。RimK は ribosomal protein S6 を基質として認識し、その C 末端に 2 ないし 4 分子のグルタミン酸を付加する反応を触媒する。LysX の上流には僅か 54 アミノ酸残基からなるタンパク質をコードする LysW が存在する。LysW はその C 末端に“EDWGE”という保存配列を有しており、この C 末端の E54 残基の γ -カルボキシル基と AAA の γ -アミノ基が、LysX によって ATP 依存的にイソペプチド結合を形成し、アセチル化に代わる保護基として機能していることが当研究室によって明らかにされた(34)。LysW を介したリジン生合成経路を図 1-9 に示した。

1-2-3 LysW の機能と特徴

LysW は Type II ACP と同様に酸性タンパク質であり、表面が正に帯電している。その一方、LysX, LysZ, LysY, LysJ, LysK の基質結合部位は負に帯電しており、LysW と静電的に相互作用することが明らかとなっている。またアルギニン生合成経路においては、中間体であるセミアルデヒドから非酵素的な分子内環化によって Δ^1 -pyrroline-2-carboxylate が生成するのを防ぐため、ArgA によって前駆体のグルタミン酸の α -amino 基にアセチル基が転移され、これが以降の反応中の保護基として機能する。一方、*T. thermophilus* で発見された新規リジン生合成では、AAA の α -amino 基はアセチル基ではなく LysW という小タンパク質によって保護される。よって LysW は、AAA からリジンへの変換において、静電相互作用により各修飾酵素に生合成性中間体を運搬するだけでなく、生合成中間体の自然環化によるシャント化合物の生成を防いでおり、semialdehyde 体という不安定な中間体を経る代謝経路が成り立つうえで必要不可欠な要素である。

LysW は C 末端の Glu 残基の γ -カルボキシル基を介して直接基質と結合する。C 末端の 5 アミノ酸残基(EDWGE)は保存されており、対応する酵素群の認識に関わっている。*T. thermophilus* の LysW/LysZ 複合体や LysW/LysY 複合体、*Sulfolobus tokodaii* 由来の LysW/ArgX 複合体、*Thermococcus kodakarensis* の LysW/LysX 複合体の X 線結晶構造解析により、EDWGE に隣接した数アミノ酸が可動性の高いアームの役割を果たすことが示された(35-37)。LysW はこれらの点において、翻訳後修飾により基質と結合するためのアーム領域を付加される他のキャリアタンパク質と比較して、非常にユニークなキャリアタンパク質といえる。また LysW と PCP は同じアミノ酸の運搬体として機能するがその基質結合様式は異なっている；PCP は 4'-PP 基のチオールを介して基質アミノ酸の α -カルボキシル基にチオエステル結合する一方、LysW は基質アミノ酸の α -アミノ基にイソペプチド結合する。LysW は基質のアミノ基に結合することから、以降では LysW 及びそのオルソログをアミノ基キャリアタンパク質(Amino group-carrier protein; AmCP)と呼ぶ。

1-2-4 アミノ基キャリアタンパク質を介した代謝経路の普遍性

好熱性好酸性古細菌 *Sulfolobus* 属はアルギニン生合成の初発反応であるグルタミン酸の α -アミノ基のアセチル化を担う ArgA ホモログ遺伝子をゲノム上に有しておらず、代わりに α -アミノ基へ LysW を転位する LysX ホモログが 2 つコードされている。このうち 1 つは LysX であり *T. thermophilus* と同様に AAA の α -アミノ基を LysW によって保護修飾する機能を有している。しかしもう一方の LysX ホモログはグルタミン酸の α -アミノ基を LysW によって保護修飾するこ

とが明らかになり、ArgX と名付けられ、リジン生合成だけでなくアルギニン生合成も LysW を介して行われることが明らかになった。また以降の反応を担う *lysZ, Y, lysJ, lysK* ホモログをゲノム上に1つずつしか存在しておらず、これらの酵素がリジン、アルギニンのそれぞれの生合成経路において bi-functional に機能する(37)。また超好熱性古細菌 *Thermococcus kodakarensis* では単独の LysX ファミリータンパク質によって LysW にリジンの前駆体 AAA とアルギニンの前駆体グルタミン酸がともに結合されることが明らかとなった。このようにアミノ基キャリアタンパク質を介したアミノ酸生合成経路は古細菌を含む複数の生物種において存在していることが示されてきた(図 1-10)。

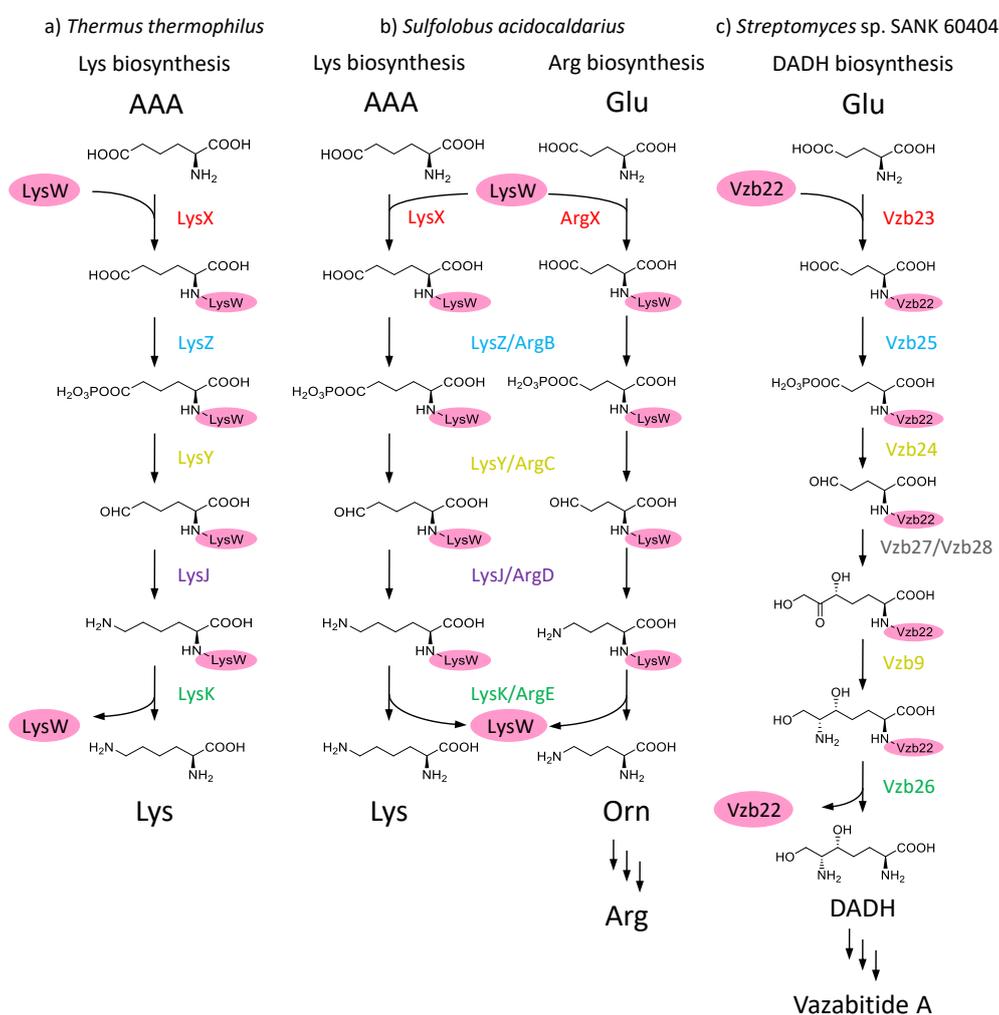


図 1-10 AmCP を介した代謝経路の比較

各代謝経路にて中心的機能を果たす AmCP をマゼンタで示した。a) 高度好熱性細菌 *T. thermophilus* におけるリジン生合成経路。LysW はリジン生合成のみに関与する。b) 好熱好酸性古細菌 *Sulfolobus* 属におけるリジン・アルギニン生合成経路。LysX, ArgX がそれぞれ

れ AAA と Glu を LysW にロードし、以降の反応は bifunctional な酵素群によって行われる。c) 放線菌 *Streptomyces* sp. SANK 60404 おける DADH 生合成経路。LysJ ホモログが存在しない代わりに、Vzb27/Vzb28, Vzb9 により炭素鎖伸長反応とアミノ基転移反応が触媒される。

1-2-5 放線菌におけるアミノ基キャリアタンパク質を介した代謝経路

放線菌は高 GC 含量グラム陽性菌であり、バクテリアであるにも関わらず糸状に生育し、多様な形態分化能を持つことが知られている。また、多様な二次代謝産物生産能でも知られており、これまでに発見された抗生物質のうち 3 分の 2 は放線菌の生産物である。

同源性検索の結果、常温菌である放線菌の複数株のゲノム上にアミノ基キャリアタンパク質ホモログをコードしていると思われる遺伝子が見出された。またその近傍には LysXYZK ホモログが保存されていたことから、同キャリアタンパク質を介した代謝経路が放線菌においても存在することが示唆された。しかしながら、放線菌は他の一般的な細菌と同様に DAP 経路によってリジンを生合成し、また ArgA によるアセチル化を初発反応とした経路によってアルギニンの生合成を行っていることから、アミノ基キャリアタンパク質はリジン・アルギニン生合成以外の物質変換に関与することが示唆された。

ごく最近、当研究室がゲノム情報を所有する *Streptomyces* sp. SANK 60404 のゲノム上にアミノ基キャリアタンパク質遺伝子 Vzb22 が見出され、これとクラスター中の LysX, LysY, LysZ, LysK ホモログ(Vzb23, Vzb25, Vzb24, Vzb26)、Transketolase (Vzb27, Vzb28)及び Transaminase (Vzb9)によりグルタミン酸から(2*S*,6*R*)diamino-(5*R*,7) dihydroxy-heptanoic acid (DADH)が生合成されることが明らかにされ(図 1-10 c)、またそれを生合成中間体とする新規二次代謝産物 vazabotide A 及び B が同定された(図 1-11)(38)。これによりアミノ基キャリアタンパク質を介した二次代謝経路の存在が明らかとなった。vazabotide A, B はジペプチド化合物であり、バリン骨格と DADH 由来と考えられる 1-azabicyclo[3.1.0]hexane 骨格(以下 azabicyclo 環と記す)を含むアミノ酸骨格(vazabotide A)、もしくはその加水分解により生じたと考えられる piperizine 環を含むアミノ酸骨格(vazabotide B)から構成される。vazabotide A と同様の azabicyclo 環を含む天然化合物はこれまで報告例が少なく、azinomycin A, B 及び ficellomycin が知られているのみである(図 1-11)(39-41)。これらはいずれも放線菌の生産する二次代謝産物であり、抗腫瘍・抗菌活性を示す(42)。特に azinomycin はその抗腫瘍活性から注目され、作用機序について多くの研究がなされてきた。azinomycin は分子内にエポキシバリン骨格と azabicyclo 環骨格を有し、これらが DNA 二本鎖の別々の鎖のプリン塩基と共有結合することでアル

キル化剤として働き、DNA 二本鎖を架橋する(43)。azinomycin 生産菌の *Streptomyces sahachiroi* においてその生合成遺伝子クラスターは同定されており、azabicyclo 環の生合成機構については明らかにされていないものの、本クラスター中に vazabotide 生合成遺伝子クラスターと同様に AmCP を含む DADH 生合成遺伝子群が含まれていることから、azinomycin の azabicyclo 環を含むアミノ酸骨格は AmCP を介して生合成されると考えられる(44)。ficellomycin の生合成遺伝子クラスターに関しては報告されていないが、vazabotide A との高度な構造類似性から、同じく AmCP を介して生合成されることが強く示唆される。

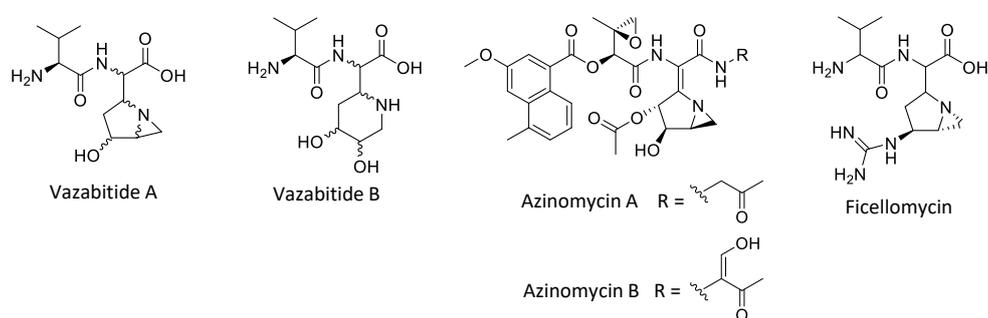


図 1-11 AmCP を介して生合成される vazabotide A, B の化学構造と azabicyclo 環を有し AmCP を介して生合成されると考えられる azinomycin と ficellomycin の化学構造

本研究を始めた当時、相同性検索の結果により *Streptomyces* sp. SANK 60404 株を含めた 8 菌種がこの AmCP 遺伝子を有していることが明らかとなった。これらの周辺の遺伝子領域を詳細に解析したところ、いずれの菌株においても周辺領域は多様であり、azinomycin や vazabotide A の生合成遺伝子クラスターとは異なる遺伝子群が存在していた。また、*Streptomyces* の生産菌である *Streptomyces griseus* のゲノム上にも AmCP 遺伝子が見出された。LysW や Vzb22 の C 末端には EDWGE の 5 残基が保存されている一方、本菌株の AmCP (SGR_3477) は C 末端の保存配列が $^{57}\text{RDWGG}^{61}$ となっている。この配列では、生合成酵素の認識に関わると推測される 57 番残基が Arg に、また基質アミノ酸との結合に必要な C 末端 Glu 残基が Gln に置換されているという特徴を有していた。このことから *S. griseus* の有する AmCP は γ -アミド基が加水分解してカルボキシル基に変換された後、他の LysW ホモログとは異なる様式で生合成酵素に認識されるキャリアタンパク質である可能性が考えられ、放線菌における AmCP マシナリーの多様性が示唆された。

以上により、AmCP を介した物質変換の仕組みが放線菌において二次代謝経路に利用されていることが示されるとともに、一定の割合で放線菌に存在し、天

天然化合物の多様性創出に寄与していることが明らかになりつつある。これが未知の天然化合物群の生合成に関わっていることは容易に推測される。前述のように A/CPC といったキャリアタンパク質を介した複雑かつ多様な二次代謝経路は広く研究されており、またゲノムデータを用いた新規薬剤候補リード化合物の探索において基本的なターゲットとなっている。一方で当研究室にて発見された AmCP を介した二次代謝経路は発見されて間もないため、まだ探索の指標とはなっておらず、またそれによって生合成される化合物の構造は未解明のままである。AmCP を指標とした生合成遺伝子クラスターの探索を行い、それが関わる二次代謝産物の構造を明らかにすることで、未開拓の天然物構造多様性を明らかにできるものと期待される。また AmCP は azinomycin の抗腫瘍活性本体である azabicyclo 環形成への関与が示唆されることから、それを介して生合成される化合物群の生理活性の新規性が期待される。

1-3 分子内窒素-窒素(N-N)結合を有する天然化合物

微生物のユニークな生体反応は天然物の生合成のみならず、地球規模の物質循環においても重要な役割を果たしている。地球上の N 原子のほとんどは極めて安定な N_2 分子の形で大気中に存在するが、これを生化学反応に利用するためには N 原子間の結合を切り離し、アンモニアとして固定する必要がある。これは窒素固定と呼ばれるプロセスで、根粒細菌等の有するニトロゲナーゼによって触媒される。固定された窒素はその後脱窒や嫌氣的アンモニア酸化(anammox)と呼ばれる生物プロセスによって再び N_2 分子に変換され、大気へと還流する。窒素循環に欠くことのできない脱窒、anammox 経路においては、ニトロゲナーゼとは対照的な機能を持つ、N 原子間の結合(N-N 結合)形成を触媒する酵素が重要な役割を果たしている。

脱窒経路における N-N 結合形成酵素は一酸化窒素還元酵素(NOR)である。NOR は硝酸呼吸により生じた 2 分子の NO から N_2O を生成する。また anammox 代謝における N-N 結合形成はヒドラジン合成酵素(HZS)によって触媒される。HZS は NH_3 と NO からヒドラジン(N_2H_4)を生成する(45)。ヒドラジンはその後 N_2 へと酸化され、 N_2 分子が大気へ戻る。一般に anammox 代謝は海洋からの N の放出の 1 割から 4 割を担うと試算されており(46)、測定地点によっては 7 割程度と試算される場合もある(47)。

一方、これらとは異なる生物プロセスにより、N-N 結合形成の後も窒素が有機物の形で固定されるケースが存在する。1950 年代に N-N 結合を含む天然化合物 macrozamine が発見されて以来、現在までに N-N 結合を含む天然化合物は 200 種類程発見されている(48)。このように報告例は比較的少ないものの、これらは土壌・海洋性細菌、カビやキノコ、植物、海綿動物など多様な生物から単離される、自然界に普遍的に存在する化合物群である。またその構造多様性も顕著であり、N-N 結合を形成する N 原子の酸化度や置換基の種類などによって複数のクラスに分類されている。加えてこれらは多様な生物活性を示し、その活性に N-N 結合が重要である場合が複数報告されている(49-54)。例えば、indolo-sesquiterpene である xiamycin が N-N 結合を介して二量化した dixiamycin 類は、単量体よりも強い抗菌活性を示す(53)。また、diazofluorene 骨格を有する lomaiviticin A は diazo 基が脱離した際に生じるラジカルによって DNA を切断する(50)。

これまでに細菌由来の N-N 結合を含む天然化合物の生合成遺伝子クラスターがいくつか報告されており、それらには azoxy 化合物 (valanimycin, azoxymycins)、hydrazide 化合物(fosfazinomycins)、diazo 化合物 (kanamycins, lomaiviticins, cremeomycin)や環状 hydrazine 骨格を含むペプチド化合物

(kutzneride)がある(55-62)(図 1-12)。これら化合物の生合成研究は盛んに行われてきたが、N-N 結合形成を触媒する酵素の報告はなく、その形成機構は明らかでない(63)。これら遺伝子クラスターを比較してもすべてに共通した遺伝子は見出されないことから、天然には N-N 結合の形成機構が複数存在すると考えられる。一方、いくつかの遺伝子クラスターではそれらに共通したものが見出される(図 1-13)。diazo 化合物 *cremeomycin* の生合成遺伝子クラスター中に見出される CreE, CreD により、アスパラギン酸から亜硝酸を生成されることが示され、これが 3, 2, 4- AHMBA の芳香族アミノ基と未知の機構により縮合することで diazo 基が形成される(64) (図 1-14)。CreE/CreD ホモログ遺伝子は hydrazide 化合物 *fosfazinomycin* の遺伝子クラスター中にも FzmM/FzmL として見出され、組換え酵素を用いた実験によりこれらホモログが同様の反応を触媒することが示された(65)。また、CreE/CreD ホモログは diazo 化合物 *kinamycin* の生合成遺伝子クラスター近傍や、環状 hydrazine 骨格を含むペプチド化合物 *kutzneride* の生産菌のゲノム中の離れた位置にもタンデムに存在していることから、多くの N-N 結合を含む天然化合物に共通した、亜硝酸を介する生合成経路が存在する可能性が予想されている(64)。一方、*fosfazinomycin* 生合成遺伝子クラスター中の FzmNOPQR のホモログ遺伝子は *kinamycin* やその類縁体 *lomaiviticin* の生合成遺伝子クラスター中にも見出される。組換え酵素を用いた実験から FzmQ/FzmR により、N-N 結合を含むヒドラジノコハク酸からアセトヒドラジンが生成することが示されているが(図 1-15)、FzmNOP の機能は未解明である(65)。これら 5 つの遺伝子産物によって、*fosfazinomycin*、*kinamycin*、及び *lomaiviticin* の生合成に共通した、N-N 結合形成後の代謝経路が形成されているものと思われる。

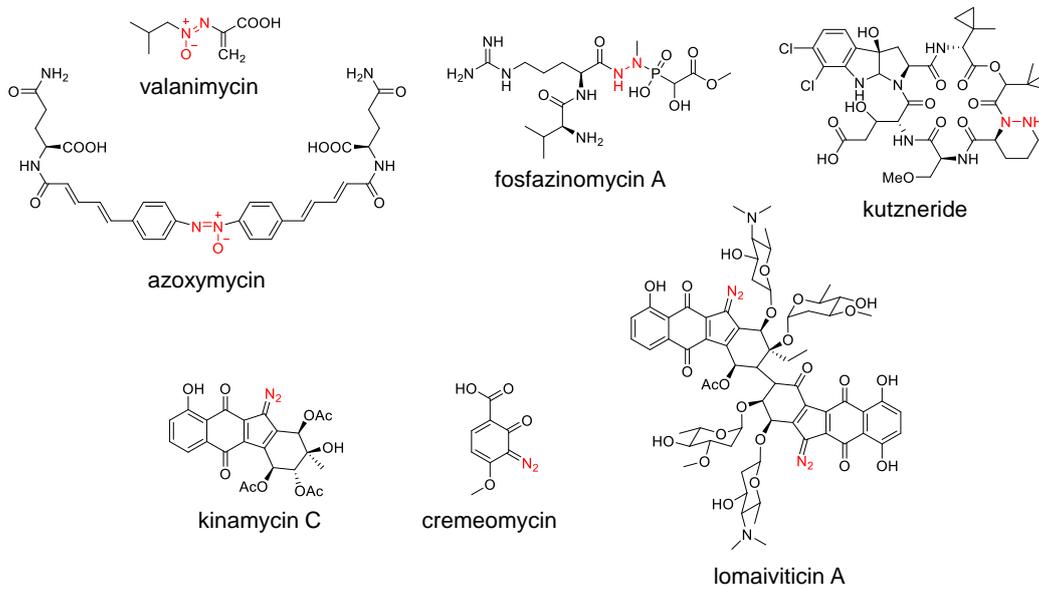
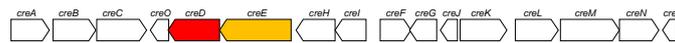


図 1-12 生合成遺伝子クラスターが明らかな N-N 結合を含む天然化合物

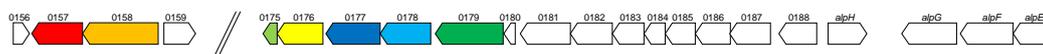
Streptomyces cremeus – cremeomycin 生合成遺伝子クラスター



Streptomyces sp. XY322 – fosfazinomycin 生合成遺伝子クラスター



Streptomyces ambofaciens – kinamycin 生合成遺伝子クラスター周辺



Salinispora pacifica DPJ-0019 – lmaiviticin 生合成遺伝子クラスターの一部



Kutzneria sp. 744 – kutzneride 生合成遺伝子クラスターの一部と
ゲノム上の離れた位置にコードされた creD/creE ホモログ遺伝子



Streptomyces sp. SoC090715LN-17 – s56-p1 生合成遺伝子クラスターの一部



図 1-13 N-N 結合を含む天然化合物の生合成遺伝子クラスターの比較
複数の遺伝子クラスターに共通して見出される遺伝子を共通の色で示した。それら遺伝子の
予想機能を示した。

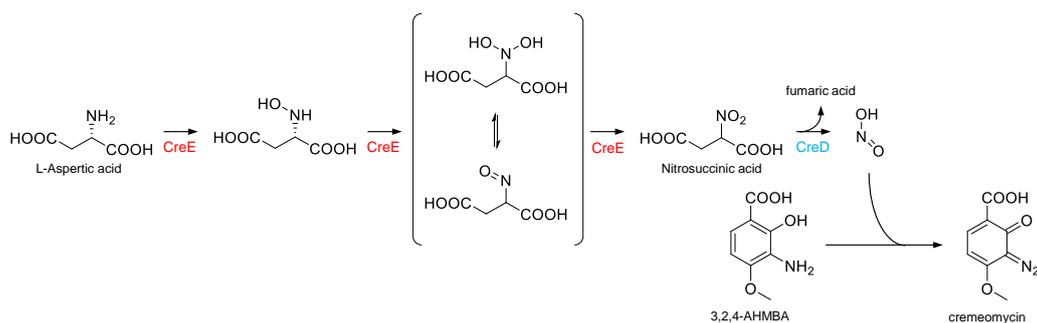


図 1-14 cremeomycin 生合成における CreE/CreD を介した亜硝酸生合成経路とそれによるジアゾ基形成

CreE による NADPH, FAD 依存的な多段階酸化反応により、アスパラギン酸がニトロコハク酸に変換されたのち、CreD によって亜硝酸が生成する。亜硝酸は 3,2,4-AHMBA と縮合し、cremeomycin が生じる。この縮合反応は酸性条件下で非酵素的に進行することが報告されている。しかし酸処理を行わない培養液中にも cremeomycin が検出されることから、ジアゾ基形成を担う酵素の存在が予想されている。

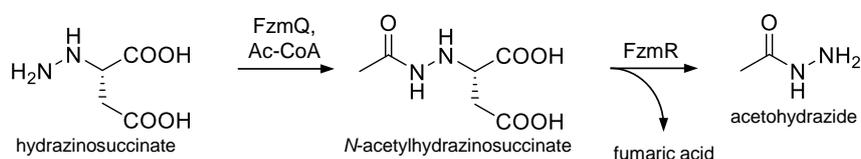


図 1-15 fosfazinomycin 生合成における FzmQ/FzmR の触媒する反応

ヒドラジノコハク酸は CreE/CreD ホモログである FzmM/FzmL により生じた亜硝酸を介して生合成されると予想されている。FzmQ がヒドラジノコハク酸にアセチル CoA からアセチル基を転移し、生じた *N*-アセチルヒドラジノコハク酸は FzmR によってアセトヒドラジドとフマル酸に分解される。アセトヒドラジドは fosfazinomycin の生合成中間体であると予想されている。興味深いことに FzmQ/FzmR 及び FzmP, FzmO, FzmN の 5 つの酵素をコードする遺伝子は kinamycin, lomaiviticin の生合成遺伝子クラスター中にも存在しており、これら化合物が類似の代謝経路によって生合成されることが示唆されるが、詳細な解析は一切行われていない。

一方で、valanimycin や azoxymycin の生合成遺伝子クラスター中には CreE/D 及び FzmNOPQR のホモログ遺伝子は見出されない。valanimycin は N-N 結合を含む化合物のうち、その生合成が最もよく研究された化合物であり、N-N 結合は上述のものとは全く異なる機構によって形成されることが示唆されている(図 1-16)。valanimycin は valine 由来の isobutylhydroxylamine と serine が tRNA 依存的に縮合して生じた不安定なエステル体 (*O*-(L-seryl)-isobutylhydroxylamine) を経て生合成される(55,66-70)。エステル中間体の未知の分子内転移反応によりアゾキシ結合が形成され(70)、生じた valanimycin hydrate が脱水することで valanimycin が生合成すると示唆されている(71)。また azoxymycin 生合成における azoxy 結合は AzoC によって形成されることが遺伝子破壊株の代謝物分析から示唆されている(62)。AzoC は aureothin 生合成における芳香族アミンの多段階酸化反応を触媒する AurF と相同性を有している。AurF は *in vitro* にて *p*-aminobenzoate (PABA) から多段階酸化反応によって *p*-hydroxylaminobenzoate (PHABA) と *p*-nitrobenzoate (PNBA) を生じると同時に、副産物として 2 分子の PABA が azoxy 結合によってつながった化合物を生じることが報告されている(72)。これは多段階酸化反応の過程で生じた hydroxylamine と nitroso、もしくは 2 分子の nitroso の非酵素的な縮合によって生じると結論されている。同様に azoxymycin 生合成においても AurF ホモログである AzoC による多段階酸化反応とそれに続く非酵素的な縮合反応により azoxy 結合が形成されると考えられる(図 1-17)。valanimycin と azoxymycin の生合成における N-N 結合形成機構の詳細は未解明であるが、これら化合物の azoxy 結合は明らかに異なる機構により形成されている。同じ azoxy 結合を有するであっても、その形成機構は異なっていることは、天然に存在する N-N 結合形成機構の多様性を表しているといえる。

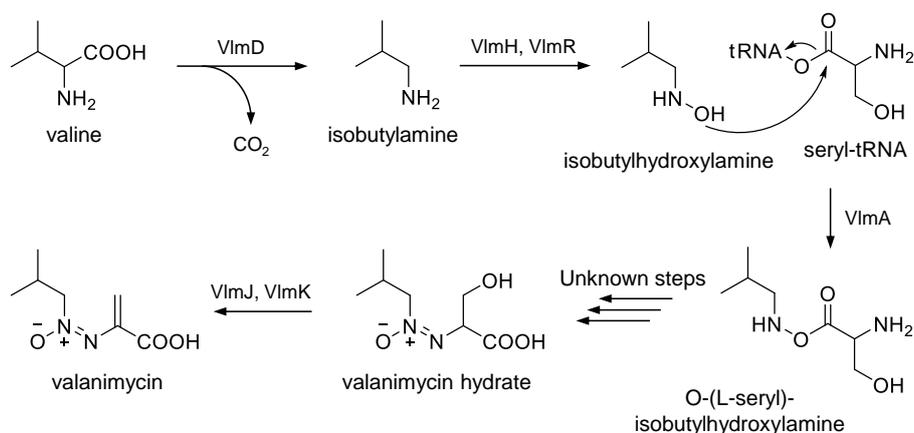


図 1-16 valanimycin 生合成経路の概略図

isobutylhydroxylamine と seryl-tRNA の縮合によって生じたエステル中華体から valanimycin hydrate への変換反応は明らかとなっていない。

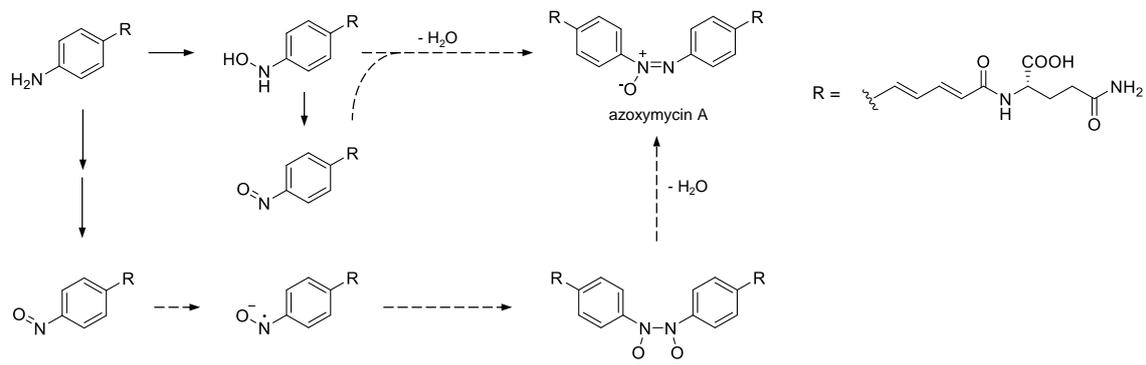


図 1-17 azoxymycin 生合成における AzoC を介したアゾキシ結合形成の
 予想反応経路

AurF ホモログである AzoC によって触媒されると予想される反応を実線の矢印で、また非酵素的に進行すると考えられる縮合反応を点線の矢印にて示した。

1-4 本研究の目的

前述のとおり、当研究室により発見された **AmCP** は一次代謝のみならず、二次代謝にも関与することが明らかにされてきた。**AmCP** は、昨今のゲノム情報を指標とした新規有用天然物の探索において基本的な指標となっているモジュラー型合成酵素において中心的な機能を果たす **A/PCP** とは多くの点において異なり、まったく新しい二次代謝産物生合成マシナリーであるといえる。データベース検索により、**AmCP** を介した生合成マシナリーが複数の放線菌に存在することが明らかとなったことから、**AmCP** を介して生合成されるアミノ酸誘導体を前駆体とする天然化合物の一群が存在することが示唆された。しかし、現在までに **AmCP** を介して生合成される化合物の報告例は **vazabotide** のみであり、それによって生合成される化合物群の多様性は明らかでない。本研究では、**AmCP** を介した生合成マシナリーを指標として、未開拓な天然化合物多様性を明らかにすることを試みた。具体的には、**AmCP** 遺伝子を有する放線菌を探索することで、その遺伝子クラスターの多様性を明らかにし、またそれらによって生合成される天然化合物を同定することを目指した。

以下、[インターネット公表できないため削除]

1-5 本論文の構成

第2章は[インターネット公表できないため削除]。

第3章では、*Streptomyces* sp. SoC090715LN-17 由来のクラスターに着目し、その生産物である新規化合物 **s56-p1** を同定し、構造決定を行った結果について述べる。また、遺伝子破壊株の代謝物分析の結果に基づき予想した **s56-p1** の生合成経路について述べる。

第4章は[インターネット公表できないため削除]。

第2章 インターネット公表できないため削除

第3章

3-1 背景及び目的

前章の PCR スクリーニングによって、Vzb22 タイプの AmCP 遺伝子を含む 12 個の機能未知遺伝子クラスターを見出した。これらの遺伝子クラスターの AmCP 遺伝子周辺には DADH 生合成遺伝子群が共通して見出された一方で、多様な NRPS 遺伝子が見出されたことから、これらの遺伝子クラスターでは DADH を共通の前駆体としながらも、多様な非リボソームペプチドが生合成されることが示唆された。

本章では AmCP を介して生合成される天然化合物の構造多様性について知見を得るため、前章で見いだされた遺伝子クラスターの生合成産物を探索した。具体的には、s56 株(*Streptomyces* sp. SoC090715LN-17)由来の AmCP 遺伝子を含むクラスターに着目し、その異種発現により生合成産物を発見、構造決定することを目指した。さらには AmCP を介して生合成される化合物の構造多様性を生む部分構造の生合成機構に関する知見を得ることを目的とした。

3-2 方法

3-2-1 菌株及び試薬類

遺伝子操作では前章と同様の手法で行い、大腸菌は 2×YT 培地を用いて培養した。コスミドライブラリーは *Streptomyces* sp. SoC090715LN-17 のゲノムを用いて作製し、宿主は *E. coli* XLI Blue MRF[®]を用いた。大腸菌を用いた *in vivo* クローニングは *E. coli* BW25141 (*lacI^q rrnB_{T14} ΔlacZ_{WJ16} ΔphoBR580 hsdR514 ΔaraBAD_{AH33} ΔrhaBAD_{LD78} galU95 endA_{BT333} uidA(ΔMluI)::pir⁺ recA1*)に pKD46 導入した *E. coli* BW25141::pKD46 を宿主として行った。放線菌の遺伝子領域の異種発現宿主には *S. lividans* TK23 を用いた。また必要に応じて Ampicillin (Amp)、Kanamycin (Km)、Chloramphenicol (Cm)、Neomycin (Neo)、Apramycin (Apr)及び Hygromycin B (Hyg)をそれぞれ 200 μg ml⁻¹、50 μg ml⁻¹、30 μg ml⁻¹、25 μg ml⁻¹、25 μg ml⁻¹ 及び 160 μg ml⁻¹ で培地に添加した。

遺伝子操作で用いた試薬類はタカラバイオや東洋紡、Bio-Rad から、液体クロマトグラフィーの移動相の添加試薬は Sigma-Aldrich, 和光純薬, TCI から、またその他の試薬は和光純薬、Sigma-Aldrich、関東化学、ナカライテスク、ニッポン・ジーンから購入した。遺伝子操作に用いたオリゴヌクレオチドはオペロンバイオテクノロジー及びファスマックから購入した。

3-2-2 目的遺伝子領域のクローニング

定法により抽出した *Streptomyces* sp. SoC090715LN-17 のゲノム 2 μg を制限酵素 *Sau3AI* によって処理し、*Bam*HI 処理により線状化したゲノム組込み型コスミドベクター pKU465cos とプラスミド保持型コスミドベクター pOJ446 にそれぞれライゲーションした。得られたライゲーション産物を LAMBDA INN *in vitro* packaging kit (ニッポン・ジーン)を用いてλファージにパッケージングし、*E. coli* XLI Blue MRF[®]に導入した。これをそれぞれ適当な抗生物質を含んだ 20 枚の LB プレートに塗布し、30 °C で 2 日間培養してコスミドライブラリーを作製した。目的領域を含むコスミドを単離するため、pKU465cos を用いて作製したライブラリーに対して *orf5_Fw/orf5_Rv* をプライマーとした PCR スクリーニングを行った。また pOJ446 を用いて作製したコスミドライブラリーに対して *orf45_Fw/orf45_Rv* をプライマーとした PCR スクリーニングを行った (表 3-2-1)。目的領域を含むコスミド *E. coli* DH5αに導入し、QIAGEN Large-construct kit (QIAGEN)を用いてコスミドを調製した。挿入配列のシーケンス解析は Genetech inc. (Daejun, South Korea)に依頼して行った。

表 3-2-1 コスミドライブラリーのスクリーニングに用いたプライマー

<i>orf5</i> _Fw	5'-GTGCTTGCGAGCAGGGTC-3'
<i>orf5</i> _Rv	5'-TCATCGCCGCACCCGATC-3'
<i>orf45</i> _Fw	5'-GTGAGTGACTTCGACGGA-3'
<i>orf45</i> _Rv	5'-TCAGCGCCCGATGAGATG-3'

3-2-3 目的遺伝子領域の異種発現、放線菌の培養及び代謝物の分析

取得したコスミドを異株放線菌 *S. lividans* TK23 にプロトプラスト・PEG 法により導入した。2 種類の和合性のコスミドを導入する際は、片方のコスミドを保持した形質転換体に再度プロトプラスト・PEG 法により二つ目のコスミドを導入した。得られた形質転換体のシングルコロニーを適切な抗生物質を添加した 10 ml の TSB 培地に植菌し、30 °C で 2 日間培養した。これを前培養液とし、適切な抗生物質を添加した 100 ml の生産培地 A に 1.0 % 植菌し、振盪速度 180 rpm にて 27 °C で 4 日間培養した。得られた培養液を 20,630 × *g* で 1 分間遠心し、上清を 10 倍量のメタノールで希釈したのち、さらに 20,630 × *g* で 10 分間遠心し残渣を除いた。得られた上清を表 3-2-2 に示す条件にて分析した。

Streptomyces sp. SoC090715LN-17 は以下のようにして培養した：
Streptomyces sp. SoC090715LN-17 のグリセロールストックを YMS++プレート培地に塗り広げ、30 °C で 2 日間培養した。得られたシングルコロニーを 10 ml の TSB 培地に植菌し、30 °C で 2 日間培養した。これを前培養液とし、100 ml の生産培地 B に 1.0 % 植菌し、振盪速度 180 rpm にて 27 °C で 4 日間培養した。代謝物の分析は *S. lividans* TK23 形質転換体と同様の方法で行った。

表 3-2-2 放線菌代謝物分析条件

Column	ACQUITY UPLC® BEH HILIC, 130 Å, 1.7 µm 2.1 mm × 50 mm Column (Waters, Milford, MA, USA)
Solvent	A) H ₂ O + 0.1 % formic acid, B) acetonitrile + 0.1 % formic acid 90 to 40 % in 5 minutes for solvent B
Flow rate	0.4 ml min ⁻¹
Column temperature	40 °C
MS detector	Triple TOF® 5600 system (ABsciex, CA, USA)
Ionization mode	ESI (positive)

3-2-4 s56-p1 の精製

S. lividans TK23::cosA/cosB のシングルコロニーを Neo 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$, Apr 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$ を含む 30 ml の TSB 培地に植菌し、30 °C で 2 日間培養した。これを前培養液とし、Neo 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$, Apr 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$ を含む 100 ml の生産培地 A が入ったバッフル 20 本に 1.0 % 植菌し、振盪速度 180 rpm にて 27 °C で 4 日間培養した。得られた培養液を 2,500 $\times g$ にて 4 °C で 15 分間遠心分離した。得られた上清を 100 ml の AG 1-X8 陰イオン交換樹脂 (Cl⁻フォーム) (Bio-Rad) を詰めたカラムにアプライした。2 カラム容量 (CV) の蒸留水で担体を洗浄したのち、レジンに吸着した化合物を 200 mM NaCl 溶液にて溶出した。溶出液は 2 CV 毎に分画し、各画分を LC-MS にて分析した。目的化合物を含む画分を混合し、1.0 N HCl 溶液を用いて pH を 7.0 に調整した。本画分を減圧蒸留により濃縮し、表 3-2-3 に示す条件にて分画した。目的化合物を含む画分を表 3-2-4、及び表 3-2-5 に示す条件によりさらに分画したのち、得られた画分を凍結乾燥した。

表 3-2-3 分取液体クロマトグラフィー条件

Column	Deverosil RPAQUEOUS-AR-5 (20 \times 200 mm) (Nomura chemical, Aichi, Japan)
Solvent	H ₂ O
Flow rate	8.0 ml min ⁻¹
Column temperature	ambient
Injection volume	3.0 ml / injection
UV detector	SSC-5410 UV-vis detector (Senshu Scientific, Tokyo, Japan) Absorbance at 200 nm was monitored.

表 3-2-4 分取液体クロマトグラフィー条件

Column	Deverosil RPAQUEOUS-AR-5 (20 \times 200 mm)
Solvent	H ₂ O + 10 mM CH ₃ COONH ₄ (pH 9.0)
Flow rate	8.0 ml min ⁻¹
Column temperature	ambient
Injection volume	3.0 ml / injection
UV detector	SSC-5410 UV-vis detector Absorbance at 267 nm was monitored.

表 3-2-5 高速液体クロマトグラフィー条件

Column	Deverosil RPAQUEOUS-AR-5 (4.6 × 200 mm) (Nomura chemical)
Solvent	H ₂ O + 10 mM CH ₃ COONH ₄ (pH9.0)
Flow rate	1.0 ml min ⁻¹
Column temperature	ambient
Injection volume	100 µl / injection
UV detector	MD-2010 Plus (Jasco, Tokyo, Japan)

3-2-5 s56-p1 の酸分解により生成するヒドラゾンの検出

表 3-2-6 に示す組成の反応液によって 4-Dimethylaminobenzaldehyde (DAB) 存在下でサンプルを酸処理し、室温で 5 分間放置した。反応液を等量のメタノールで希釈し、20,630 × g で 10 分間遠心し残渣を除いた。得られた上清を表 3-2-7 に示す条件にて分析した。

表 3-2-6 DNFB 誘導体化反応液

1.0 V	Sample
1.0 V	5 % DNFB dissolved in methanol
0.5 V	DMSO
0.1 V	2 N NaOH

サンプル溶液量を 1.0 V として示した。

表 3-2-7 UPLC 分析条件

Column	ACQUITY UPLC BEH C18 Column, 130 Å, 1.7 µm, 2.1 mm × 50 mm (Waters)
Solvent	A) H ₂ O + 0.1 % formic acid, B) acetonitrile + 0.1 % formic acid 2 to 98 % in 5 minutes for solvent B
Flow rate	0.4 ml min ⁻¹
Column temperature	40 °C
UV detector	ACQUITY UPLC PDA (Waters)
MS detector	ACQUITY QDa (Waters)
Ionization mode	ESI (positive / negative)

3-2-6 化合物 2 の精製

S. lividans TK23::cosA のシングルコロニーを Neo 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$ を含む 30 ml の TSB 培地に植菌し、30 °C で 2 日間培養した。これを前培養液とし、Neo 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$ を含む 100 ml の生産培地 A が入ったバツフル 20 本に 1.0 % 植菌し、振盪速度 180 rpm にて 27 °C で 4 日間培養した。得られた培養液を 2,500 \times g にて 4 °C で 15 分間遠心分離した。上清の pH を 1.0 N HCl 溶液を用いて 2.0 に調整したのち、活性炭を詰めたカラムにアプライした。2 CV の蒸留水で担体を洗浄したのち、吸着した化合物をそれぞれ 0 %, 10 %, 50 %, 100 % (v/v) のメタノールを含む 2 CV の溶液で溶出した。目的化合物を含む画分を減圧蒸留してメタノールを除いたのち、AG 50W 陽イオン交換樹脂(H⁺フォーム) (Bio-Rad)を詰めたカラムにアプライした。担体に吸着した化合物をそれぞれ 0 M, 0.1 M, 0.5 M, 1.0 M のアンモニア水を用いて段階的に溶出したのち、目的化合物を含む画分を減圧蒸留し、さらに AG 1-X8 陰イオン交換樹脂(OH⁻フォーム) (Bio-Rad)を詰めたカラムにアプライした。担体に吸着した化合物をそれぞれ 0 M, 0.1 M, 0.5 M, 1.0 M の炭酸水素ナトリウム溶液を用いて段階的に溶出したのち、目的化合物を含む画分を減圧蒸留し、表 3-2-8 に示す条件にて分画した。得られた画分に含まれる移動相添加物である dibutylammonium acetate (DBAA) (TCI, Tokyo, Japan)を除去するため、陰イオン交換樹脂を用いた前述の方法により再度精製したのち、目的化合物を含む画分を表 3-2-9 に示す条件にて分取した。これにより得られた画分を凍結乾燥した。

表 3-2-8 分取液体クロマトグラフィー条件

Column	CAPCELL PAK C18 MGII (20 \times 200 mm) (Shiseido, Tokyo, Japan)
Solvent	5 % Methanol + 5 mM DBAA (TCI)
Flow rate	8.0 ml min ⁻¹
Column temperature	ambient
Injection volume	3.0 ml / injection
UV detector	SSC-5410 UV-vis detector Absorbance at 200 nm was monitored.

表 3-2-9 分取液体クロマトグラフィー条件

Column	Deverosil RPAQUEOUS-AR-5 (4.6 × 200 mm)
Solvent	2 % methanol + 0.1 % trifluoroacetic acid (Wako)
Flow rate	8.0 ml min ⁻¹
Column temperature	ambient
Injection volume	1.0 ml
UV detector	SSC-5410 UV-vis detector Absorbance at 200 nm was monitored.

3-2-7 NMR 分析

すべての NMR スペクトルは ECA-600 spectrometer (JEOL, Tokyo, Japan) を用いて取得した。また ¹H NMR スペクトル及び各種 2 次元 NMR スペクトルは 600 MHz、¹³C NMR スペクトルは 150 MHz にて取得した。分析する化合物は 90 % H₂O + 10 % D₂O の混合液に溶解した。また、すべての測定は室温 (25 °C) で行った。

3-2-8 λ Red 組換え酵素を発現した大腸菌を用いた改変コスミドの作製

E. coli BW25141::pKD46 のシングルコロニーを Amp 200 μg ml⁻¹ を含む 2×YT 培地に植菌し、30 °C で終夜培養した。これを前培養液とし、Amp 200 μg ml⁻¹ を含む 200 ml の 2×YT 培地に 1.0 % 植菌した。この際終濃度 50 mM で L-arabinose を添加した。これを OD₆₀₀: 0.5 程度となるまで 30 °C で培養し、得られた菌体から定法により電気穿孔方用のコンピテントセルを作製した。これに cosA, cosB をそれぞれ導入し、*E. coli* BW25141::pKD46::cosA 及び *E. coli* BW25141::pKD46::cosB を作製した。表 3-2-10 に示したプライマーを用いて、pKU487 及び pKU493h を鋳型とした PCR により、約 40 bp のホモロジーアームが付加した耐性遺伝子を増幅した。これを電気穿孔法により、*E. coli* BW25141::pKD46::cosA もしくは *E. coli* BW25141::pKD46::cosB に導入し、目的領域に耐性遺伝子が挿入された改変コスミドを取得した。*E. coli* BW25141::pKD46 から抽出したプラスミド画分には pKD46 が混入しているため、これをさらに *E. coli* DH5α に導入して単一の改変コスミドを得た。

表 3-2-10 改変プラスミドの構築に用いたプライマー

Oligonucleotide	Sequence	Constructed cosmids
pOJ446_hph_Fw	5'-GCTATGATCGACTGATGTCATCAGCGGTGGAGTGCAATGTCGTGACACAAGAATCCCTG-3'	cosB ^{hph}
pOJ446_hph_Rv	5'-ACCTTGCCCCTCCAACGTATCTCGTTCTCCGCTCATGAGCTCAGGCCCGGGGGCGGT-3'	cosB ^{hph}
Δ orf5_Fw	5'-TCAGCGACACCAGAGCGCCCGCTGGCTGCGGGATCGCGGTGCGGGTACCGAGCGAACGCGTT-3'	Δ orf5cosA
Δ orf5_Rv	5'-CGTCTCGGTACACTCCCCGACGAACCGACACCCATTCAAATTCGAGCGACTCGAGT-3'	Δ orf5cosA
Δ orf10_Fw	5'-GACCAGGCTTCCGCATTCCGTGCGGTGAGCGGGCCGGTTAAATTCGAGCGACTCGAGT-3'	Δ orf10cosA
Δ orf10_Rv	5'-CAGCATCTCTTTTCGAAAGCTCCGGAGGCCGTGACATGCGGGTACCGAGCGAACGCGTT-3'	Δ orf10cosA
Δ orf37_Fw	5'-CCGCTCGCCGATTGACCATCTGAGTGAGGATCACGATGCGGGTACCGAGCGAACGCGTT-3'	Δ orf37cosB'
Δ orf37_Rv	5'-GCGGGCGGTGCGACGGCGCCCGTCCCGGTCTGCTTCAAATTCGAGCGACTCGAGTACC-3'	Δ orf37cosB'
Δ orf38_Fw	5'-GGACCTTTCGTGGGATCCGTAGAGAAGCCGATGACGGTGCGGGTACCGAGCGAACGCGTT-3'	Δ orf38cosB'
Δ orf38_Rv	5'-CCGTCCGCTCTTGCCGACCAGTCGATGAACGACATCGCCATAATTCGAGCGACTCGAGT-3'	Δ orf38cosB'
Δ orf39_Fw	5'-GGCCAAGAGCGGACGGGGCGCGCAGTGGACCGGTAGACCGGGTACCGAGCGAACGCGTT-3'	Δ orf39cosB'
Δ orf39_Rv	5'-GGCCCCGGTGGGGTGAGAGCCAGGGCGGCGACGGTCTCAATTCGAGCGACTCGAGTACC-3'	Δ orf39cosB'
Δ orf40_Fw	5'-CCGACCGGGGCCACCTCCCCGCTACCGCAGAGGCTGTCATGACGGGTACCGAGCGAACGCGTT-3'	Δ orf40cosB'
Δ orf40_Rv	5'-CCTCGGAGCTCCACCGCCCTGGTGCGCCAGGGCGGACTGCTAATTCGAGCGACTCGAGTACC-3'	Δ orf40cosB'
Δ orf41_Fw	5'-GGGCACCCGCTTCTTCGGCACCGGCGAGCAGCGATGACCCGGGTACCGAGCGAACGCGTT-3'	Δ orf41cosB'
Δ orf41_Rv	5'-GATGCGCTTGCGGATCGGTTTGAAGTGGAGGTGAGGAGGCCAATTCGAGCGACTCGAGT-3'	Δ orf41cosB'
Δ orf43_Fw	5'-CTCCGCCCCACACCCCTGAAGGGATGAGTTCCTTTGCGGGTACCGAGCGAACGCGTT-3'	Δ orf43cosB'
Δ orf43_Rv	5'-GAGCTGGTCTCGACCGAGGGCCATTCGGCGCGGAGCACCGAAATTCGAGCGACTCGAGT-3'	Δ orf43cosB'
Δ orf44_Fw	5'-CCGCCGCTCGGCAGGGCGGTCAACCCGTGCGCGTGACCCGGGTACCGAGCGAACGCGTT-3'	Δ orf44cosB'
Δ orf44_Rv	5'-GTGCCGGGGCCGGACACGTATGCGGGTTCGCACCTTCAAATTCGAGCGACTCGAGTACC-3'	Δ orf44cosB'

3-2-9 ピリドキサーリン酸(PLP)共存下での s56-p1 酸加水分解

表 3-2-11 に示す組成の反応液に s56-p1 を添加し室温で 10 分放置したのち、等量のメタノールを加え、20,630 × g で 10 分間遠心し残渣を除いた。得られた上清を表 3-2-12 に示す条件にて分析した。

表 3-2-11 s56-p1 酸加水分解反応液 (100 μl)

10 mM	Pyridoxal phosphate
0.5 N	HCl

表 3-2-12 s56-p1 酸加水分解反応液分析条件

Column	CAPCELL PAK C ₁₈ IF 2.0 mm × 50 mm (Shiseido)
Solvent	A) H ₂ O + 0.1 % formic acid, B) acetonitrile + 0.1 % formic acid 2 to 98 % in 5 minutes for solvent B
Flow rate	0.4 ml min ⁻¹
Column temperature	40 °C
MS detector	Triple TOF® 5600 system
Ionization mode	ESI (positive)

3-3 結果

3-3-1 *Streptomyces* sp. SoC090715LN-17由来のAmCP遺伝子を含むクラスターのクローニング

本菌株の AmCP 遺伝子周辺には DADH の生合成に必要な生合成酵素ホモログ(Vzb23, Vzb24, Vzb25, Vzb27, Vzb28, Vzb9, 及び Vzb26 の各ホモログ)がコードされているのに加え、8つの *orf*(*orf37-orf44*)からなる機能未知の遺伝子クラスターがコードされていた。BLAST 検索の結果、この遺伝子クラスターは AmCP 遺伝子とは独立して多くの細菌に分布していることが判明し、*orf37-orf44* は機能的に関連があると考えられた(図 3-3-1)。また、*orf37-orf44* は常に AmCP 遺伝子の近傍にコードされているわけではなく、その周辺領域は多様であった。*orf37-orf44* ホモログ遺伝子の近傍に AmCP 遺伝子が見出される菌株は NCBI データベース上に 2 株(*Catenulispora acidiphila*, *Streptomyces* sp. CNT302)存在するのみであった。*orf37-orf44* からなるクラスターは既知化合物の生合成遺伝子クラスター中には見出されず、その生合成産物を予想することは困難であったが、これらは多くの細菌に分布していることから、本遺伝子クラスターは、複数の天然化合物に共通した未知の部分構造の生合成経路をコードしていると予想した。また、*Streptomyces* sp. SoC090715LN-17 においては、本遺伝子クラスターが AmCP を介した生合成機構と協調して未知の天然化合物の生合成を行う可能性を考えた。この予想に基づき、*Streptomyces* sp. SoC090715LN-17 における AmCP 含有遺伝子クラスターの範囲を *orf5-orf44* の約 50 kb と予想し、生合成遺伝子クラスター全長のクローニングを試みた。本領域はコスミドベクターの挿入領域の限界(約 40 kb)を超えていたため、単一のコスミドベクターを用いた全長のクローニングは困難であると予想された。このため、生合成遺伝子クラスター全長を二種類の和合性のコスミドベクターを用いてクローニングすることとした。

ゲノム組込み型コスミドベクター pKU465cos とプラスミド保持型コスミドベクター pOJ446 をベースとした *Streptomyces* sp. SoC090715LN-17 のコスミドライブラリーをそれぞれ作製した。pKU465cos を用いたライブラリーと pOJ446 を用いたライブラリーそれぞれ *orf5* (“vzb23”)と *orf45* (SDR superfamily)を標的としたプライマーを用いて PCR スクリーニングし、それぞれのライブラリーから *cosA* 及び *cosB* を取得した。これらコスミドのシーケンス解析により、*cosA* は *orf0-orf34* を含む 48,321 bp の領域を挿入配列に有し、*cosB* は *orf22-orf50* を含む 37,856 bp の領域を挿入配列に有していることが判明した。これにより両コスミドにより合わせて 67,922 bp の領域をクローニングすることができた。*cosA* は全ての DADH 生合成遺伝子及び 3 つの NRPS 遺

伝子を含む一方、*cosB* は一部の DADH 生合成遺伝子及び 1 つの NRPS 遺伝子、*orf37-orf44* からなる保存されたクラスターを含んでいた。本領域にコードされた遺伝子の配向と BLAST 検索により予想された機能を図 3-3-2、及び表 3-3-1 に示した。



図 3-3-1 細菌に分布する 8 つの *orf* から成る機能未知遺伝子カセット *orf37-orf44* ホモログ遺伝子からなる細菌に広く分布した機能未知遺伝子クラスターのうち代表的なものを示した。ホモログ遺伝子は同じ色で示した。また各遺伝子名及びアノテーションを記した。

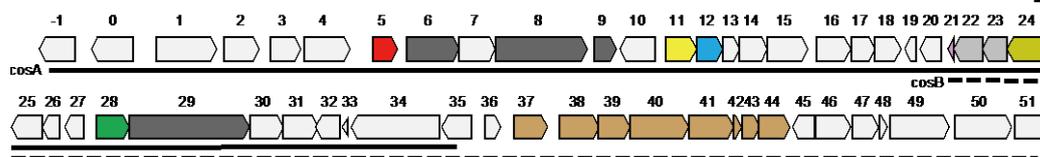


図 3-3-2 cosA, cosB に含まれる遺伝子の配向

cosA に含まれる領域を実線で、cosB に含まれる領域を破線で示した。

表 3-3-1 cosA 及び cosB に含まれる領域にコードされた遺伝子の予想機能

ORF	AA	Proposed function	Homologous protein [Origin]	Id/Si
ORF0	472	hypothetical protein	sporulation associated protein [<i>Streptomyces pactum</i>]	86/91
ORF1	678	aminotransferase	asparagine synthase [<i>Streptomyces flavogriseus</i> ATCC 33331]	69/78
ORF2	403	hypothetical protein	DNA polymerase III subunit delta [<i>Streptomyces bingchengensis</i> BCW-1]	80/87
ORF3	337	hypothetical protein	hypothetical protein SCAT_2854 [<i>Streptomyces cattleya</i> NRRL 8057 = DSM 46488]	39/54
ORF4	522	hypothetical protein	probable exported protease [<i>Streptomyces venezuelae</i> ATCC 10712]	62/75
ORF5	278	glutamate-AmCP ligase	Vzb23 [<i>Streptomyces</i> sp. SANK 60404]	65/76
ORF6	590	NRPS (A-PCP)	peptide synthetase [<i>Renibacterium salmoninarum</i> ATCC 33209]	64/78
ORF7	412	cytochrome P450	cytochrome P450 [<i>Micromonospora aurantiaca</i> ATCC 27029]	58/73
ORF8	1030	NRPS (A-PCP-C)	peptide synthetase [<i>Renibacterium salmoninarum</i> ATCC 33209]	51/65
ORF9	256	NRPS (TE)	thioesterase [<i>Streptomyces tsukubaensis</i> NRRL18488]	56/70
ORF10	398	amide synthase	phosphoribosylglycinamide synthetase [<i>Catenulispora acidiphila</i> DSM 44928]	79/90
ORF11	342	AmCP-L-glutamyl-5-phosphate reductase	Vzb24 [<i>Streptomyces</i> sp. SANK 60404]	63/74
ORF12	290	AmCP-L-glutamate kinase	Vzb25 [<i>Streptomyces</i> sp. SANK 60404]	62/70
ORF13	187	adenylsulfate kinase	Vzb20 [<i>Streptomyces</i> sp. SANK 60404]	70/81
ORF14	315	sulfate adenytransferase	Vzb19 [<i>Streptomyces</i> sp. SANK 60404]	80/88
ORF15	451	sulfate adenytransferase	Vzb18 [<i>Streptomyces</i> sp. SANK 60404]	81/86
ORF16	385	transporter	sulfate ABC transporter substrate-binding protein [<i>Streptomyces</i> sp. CNT302]	84/90
ORF17	267	transporter	ABC transporter ATP-binding protein [<i>Streptomyces pristinaespiralis</i> ATCC 25486]	84/89
ORF18	296	transporter	transport system integral membrane protein [<i>Streptomyces ambifaciens</i> ATCC 23877]	76/85
ORF19	110	hypothetical protein	hypothetical protein [<i>Kitasatospora setae</i> KM-6054]	83/89
ORF20	234	phosphopantetheinyl transferase	phosphopantetheinyl transferase [<i>Streptomyces pristinaespiralis</i> ATCC 25486]	45/55
ORF21	65	amino group carrier protein (AmCP)	Vzb22 [<i>Streptomyces</i> sp. SANK 60404]	59/78
ORF22	323	transketolase	Vzb28 [<i>Streptomyces</i> sp. SANK 60404]	58/71
ORF23	280	transketolase	Vzb27 [<i>Streptomyces</i> sp. SANK 60404]	60/71
ORF24	431	aminotransferase	Vzb9 [<i>Streptomyces</i> sp. SANK 60404]	56/67
ORF25	345	hypothetical protein	Vzb10 [<i>Streptomyces</i> sp. SANK 60404]	40/54
ORF26	191	hypothetical protein	Vzb11 [<i>Streptomyces</i> sp. SANK 60404]	52/67
ORF27	216	hypothetical protein	Vzb21 [<i>Streptomyces</i> sp. SANK 60404]	49/66
ORF28	372	AmCP-DADH carboxypeptidase	Vzb26 [<i>Streptomyces</i> sp. SANK 60404]	70/78
ORF29	1350	NRPS(C-A-PCP-TE)	Vzb7 [<i>Streptomyces</i> sp. SANK 60404]	38/51
ORF30	383	dehydrogenase	Vzb6 [<i>Streptomyces</i> sp. SANK 60404]	40/56
ORF31	384	dehydrogenase	Vzb5 [<i>Streptomyces</i> sp. SANK 60404]	40/48
ORF32	270	regulator	two component LuxR family transcriptional regulator [<i>Streptomyces sviveus</i> ATCC 29083]	82/89
ORF33	58	hypothetical protein	predicted protein [<i>Streptomyces sviveus</i> ATCC 29083]	44/56
ORF34	987	regulator	transcriptional activator [<i>Streptomyces sviveus</i> ATCC 29083]	79/87
ORF35	328	amide synthase	phosphoribosylglycinamide synthetase [<i>Streptomyces sviveus</i> ATCC 29083]	74/83
ORF36	185	hypothetical protein	conserved hypothetical protein [<i>Streptomyces sviveus</i> ATCC 29083]	76/85
ORF37	383	dehydrogenase	acyl-CoA dehydrogenase domain-containing protein [<i>Catenulispora acidiphila</i> DSM 44928]	81/88
ORF38	437	oxygenase	L-lysine 6-monoxygenase [<i>Catenulispora acidiphila</i> DSM 44928]	85/90
ORF39	352	oxidoreductase	FAD dependent oxidoreductase [<i>Catenulispora acidiphila</i> DSM 44928]	74/82
ORF40	661	ligase	methionine-tRNA ligase [<i>Catenulispora acidiphila</i> DSM 44928]	78/86
ORF41	505	ligase	AMP-dependent synthetase and ligase [<i>Catenulispora acidiphila</i> DSM 44928]	78/86
ORF42	87	hypothetical protein	hypothetical protein Caci_6316 [<i>Catenulispora acidiphila</i> DSM 44928]	83/86
ORF43	205	acyltransferase	N-acetyltransferase GCN5 [<i>Catenulispora acidiphila</i> DSM 44928]	79/90
ORF44	342	acyltransferase	peptidase C45 acyl-coenzyme A:6-aminopenicillanic acid acyl-transferase [<i>Catenulispora acidiphila</i> DSM 44928]	76/84
ORF45	257	dehydrogenase	short-chain dehydrogenase/reductase SDR [<i>Catenulispora acidiphila</i> DSM 44928]	75/84
ORF46	393	esterase	acetyl esterase [<i>Streptomyces sviveus</i> ATCC 29083]	69/82
ORF47	294	acyltransferase	3-oxoacyl-ACP synthase [<i>Catenulispora acidiphila</i> DSM 44928]	73/83
ORF48	87	hypothetical protein	hypothetical protein Caci_6311 [<i>Catenulispora acidiphila</i> DSM 44928]	49/68
ORF49	661	hypothetical protein	hypothetical protein [<i>Streptomyces violaceusniger</i> Tu 4113]	46/57
ORF50	652	hypothetical protein	hypothetical protein Caci_6300 [<i>Catenulispora acidiphila</i> DSM 44928]	62/75

3-3-2 *Streptomyces* sp. SoC090715LN-17 由来の AmCP 遺伝子を含むクラスターの異種発現による s56-p1 の発見

Streptomyces sp. SoC090715LN-17 由来の AmCP 遺伝子を含む遺伝子クラスターの産物を同定することを目指し、本遺伝子クラスターの異種発現を行った。プロトプラスト-PEG 法により、異種放線菌 *Streptomyces lividans* TK23 に cosA と cosB を段階的に導入し、*S. lividans* TK23::cosA/cosB を作製した。また対照として、cosA 及び挿入配列を持たない pOJ446 を保持した *S. lividans* TK23::cosA/pOJ446 を作製した。これら形質転換体を培養し、培養上清を LC-MS を用いて分析したところ、*S. lividans* TK23::cosA/cosB の代謝物中に、予想分子式 $C_{16}H_{27}N_6O_9S$ (m/z 479.1555 [M+H]⁺) に相当する m/z 479.1564 [M+H]⁺を示す新たな化合物の蓄積を見出した (図 3-3-3a)。本化合物は *S. lividans* TK23::cosA/pOJ446 の代謝物中には見出されなかったことから、cosB に含まれる遺伝子とその生合成に必須であることが示唆された。また興味深いことに、本化合物は親株である *Streptomyces* sp. SoC090715LN-17 の代謝物中にも見出された。これにより本化合物の異種生産に成功したといえる。親株における本化合物の生産量は形質転換体のそれと比較して著しく少量だった。本化合物を s56-p1 と名づけ、その化学構造を決定するために単離を試みた。

S. lividans TK23::cosA/cosB を生産培地 A で培養し、その培養上清から、陰イオン交換カラム及び逆相系カラムを用いた各種分取用液体クロマトグラフィーにより目的化合物を精製した。なお、目的化合物は酸・塩基性条件下で容易に分解することが判明したため、精製の過程で画分の pH は常に中性になるよう調整した。その結果、2.0 L の培養液から 12.0 mg の、やや橙色を呈した粉末を得た。この粉末を 90 % H₂O + 10 % D₂O の混合液に溶解し、一次元 NMR (¹H, ¹³C)及び各種 2 次元 NMR (¹H-¹H COSY, ¹H-¹³C HSQC, ¹H-¹³C HMBC, ¹H-¹⁵N HMBC)による分析に供した。得られたスペクトルから s56-p1 の全体構造を図 3-3-4 のように決定した。s56-p1 はグリシンと DADH 由来と考えられるアミノ酸骨格からなるジペプチドであった。興味深いことに、DADH 由来骨格は高度に修飾されており、ピロリジン環の窒素原子が水酸化されていたほか、スルフィド結合を介して *N*-アセチルシステインが結合していた。これらに加え興味深いことに、天然物ではこれまで前例のない glyoxylate hydrazone ユニットがエステル結合により付加していた。glyoxylate hydrazone 部分構造は以下の点に基づき決定した：①s56-p1 は 267 nm 付近に極大吸収を有するが、これはメチルエステルグリオキシルヒドラゾンの極大吸収波長と類似している(文献値: 269 nm) (図 3-3-5a)。②¹H-¹⁵N HMBC により、H13 から 2 つの N 原子(N14 と NH₂-15)への相関がみられた (図 3-3-5b)。③ s56-p1 を 4-dimethylaminobenzaldehyde (DAB)存在下で酸処理したところ、極大吸収波長

485 nm を有するアジン化合物の形成が確認された (図 3-3-6)。これは s56-p1 の酸分解によりヒドラジン(N₂H₄)が生成したことを示しており、s56-p1 分子内に窒素原子同士の共有結合(N-N 結合)が存在することを示している。

s56-p1 が AmCP を介して生合成されるか検証するため、AmCP に初発物質であるグルタミン酸を結合する機能を有する Vzb23 のホモログ遺伝子 *orf5* の破壊株を作製した。まず、λ Red 組換え酵素を発現した大腸菌を用いて、*cosA* 上の *orf5* をアプラマイシン耐性遺伝子 *aad(3)IV* を挿入して破壊した $\Delta orf5cosA$ を作製した。同様にして *cosB* のベクター領域にコードされている *aad(3)IV* 遺伝子をハイグロマイシン B 耐性遺伝子 *hph* に置き換えた改変コスミド *cosB^{hph}* を作製した。これらを *S. lividans* TK23 に導入し、*orf5* の破壊株 *S. lividans* TK23:: $\Delta orf5cosA/cosB^{hph}$ を作製した。*orf5* 破壊株の培養上清を LC-MS にて分析したところ、s56-p1 の生産が失われていた (図 3-3-3a)。このことから、*orf5* が s56-p1 の生合成に関与することが示唆され、s56-p1 は AmCP を介して生合成されることが強く示唆された。

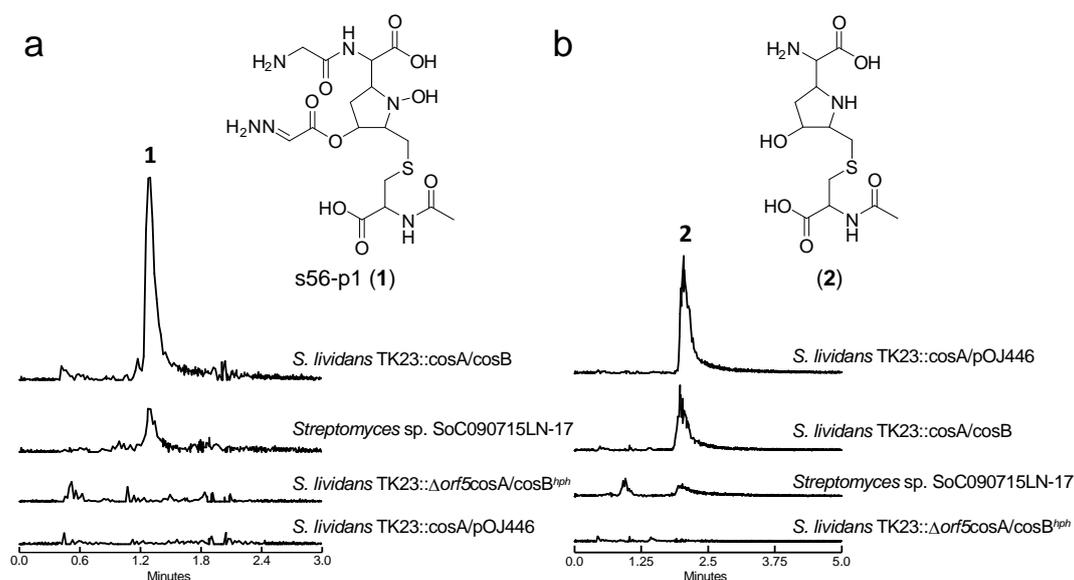
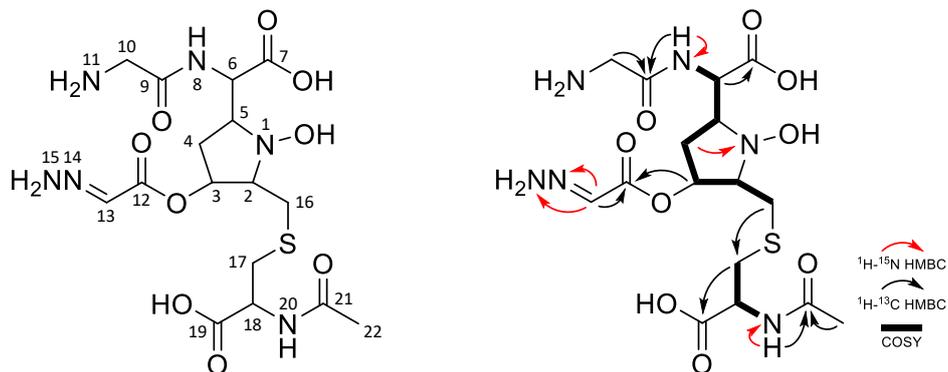


図 3-3-3 *Streptomyces* sp. SoC090715LN-17 及び *S. lividans* TK23 形質転換体代謝物の LC-MS による分析

a) XIC; *m/z* 479.1555 及び s56-p1 の構造を示した。b) XIC; *m/z* 336.1224 及び化合物 2 の構造を示した。



	δ_C/δ_N	δ_H	(m, J_H in Hz)
N-1	143.8		
2	71.8	3.14	(ddd, 4.8, 4.8, 4.8)
3	73.4	4.93	(ddd, 2.4, 4.8, 7.2)
4	28.5	1.66	(ddd, 2.4, 7.2, 14.4)
		1.87*	(m)
5	66.5	3.44	(ddd, 4.2, 7.2, 10.8)
6	54.1	4.50	(dd, 4.2, 7.8)
7	176.0		
NH-8	112.2	8.06	(d, 7.8)
9	167.3		
10	40.9	3.69	(d, 16.2)
		3.75	(d, 16.2)
NH ₂ -11	-		
12	165.6		
13	127.6	6.97	(s)
N-14	361.4		
NH ₂ -15	121.0		
16	32.2	2.68	(dd, 4.8, 13.8)
		2.83	(dd, 4.8, 13.8)
17	34.9	2.73	(dd, 8.4, 13.8)
		3.00	(dd, 4.2, 13.8)
18	54.6	4.21	(ddd, 4.2, 7.8, 8.4)
19	177.1		
NH-20	126.3	7.88	(d, 7.8)
21	173.8		
22	22.1	1.88	(s)

Solvent: 90% H₂O + 10% D₂O

¹H NMR: 600 MHz, ¹³C NMR: 150 MHz

δ_N was assigned from ¹H-¹⁵N HMBC experiment.

* δ_H was assigned from HSQC experiment.

図 3-3-4 s56-p1 の構造解析

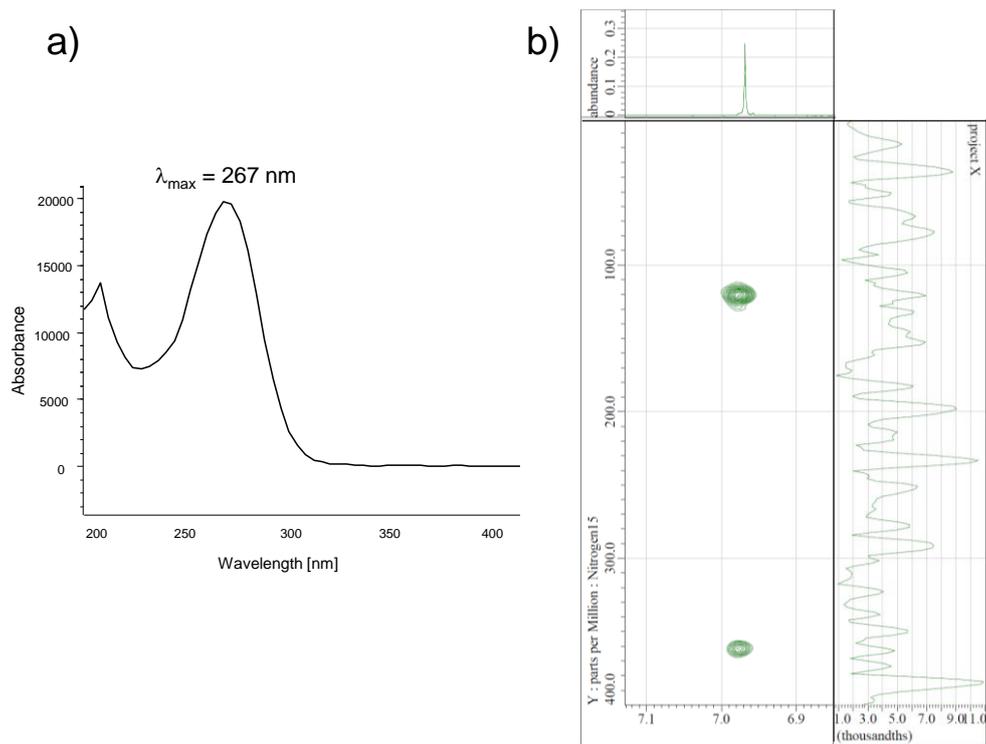


図 3-3-5

a) s56-p1 の UV 吸収スペクトル

b) s56-p1 の ^1H - ^{15}N HMBC 相関。横軸に δ_{H} 、縦軸に δ_{N} を示した。
H13 (6.97 ppm)から N-14 (361.4 ppm)と NH₂-15 (121.0 ppm)への相関が確認できる。

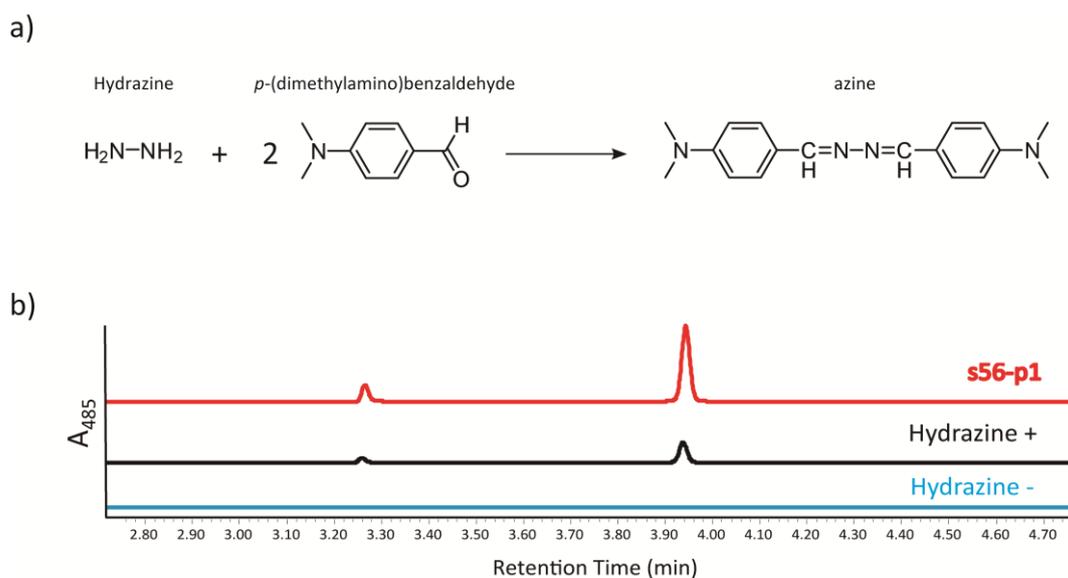


図 3-3-6 s56-p1 の酸分解により生成したヒドラジンの検出

a) hydrazine と *p*-(dimethylamino)benzaldehyde (DAB)の縮合反応

b) DAB 存在下で酸処理した s56-p1 溶液の UPLC による分析

3-3-2 遺伝子破壊株の代謝物分析(*orf10*, *orf37-orf44*)

前節にて対照として用いた *S. lividans* TK23::cosA/pOJ446 の代謝物中に予想分子式 $C_{12}H_{22}N_3O_6S$ (m/z 336.1224 [M+H]⁺) に相当する m/z 336.1227 [M+H]⁺を示す新たな化合物 2 が顕著に蓄積していることを見出した。本化合物は *S. lividans* TK23::cosA/cosB の代謝物中にも見出される一方、*S. lividans* TK23::cosA/cosB から *orf5* だけを消失させた *S. lividans* TK23:: Δ *orf5*cosA/cosB^{hph}のそれには見出されなかったことから、AmCP を介して生合成されることが示唆された。化合物 2 の化学構造を決定するため、本化合物の単離を試みた。

検討の結果、化合物 2 は s56-p1 とは異なり、酸・塩基性条件下でも安定であることが判明した。cosA のみを保持した形質転換体 *S. lividans* TK23::cosA の培養上清から、活性炭カラム、陰イオン交換カラム及び各種分取用液体クロマトグラフィーを用いて目的化合物を単離した。その結果、2.0 L の培養液から 29.3 mg の白色の粉末を取得した。これを重水に溶解し、一次元 NMR (¹H, ¹³C) 及び各種 2 次元 NMR (¹H-¹H COSY, ¹H-¹³C HSQC, ¹H-¹³C HMBC)による分析に供した。得られたスペクトルから化合物 2 の全体構造を図 3-3-7 のように決定した。化合物 2 は s56-p1 の部分構造であり、DADH 由来骨格からピロリジン環の水酸基とグリオキルヒドラゾン部位を除いた構造を有していた。このことから、化合物 2 は s56-p1 の生合成中間体であること、及び s56-p1 の DADH 由来骨格の生合成に必要な遺伝子は全て cosA にコードされていることが示唆された。

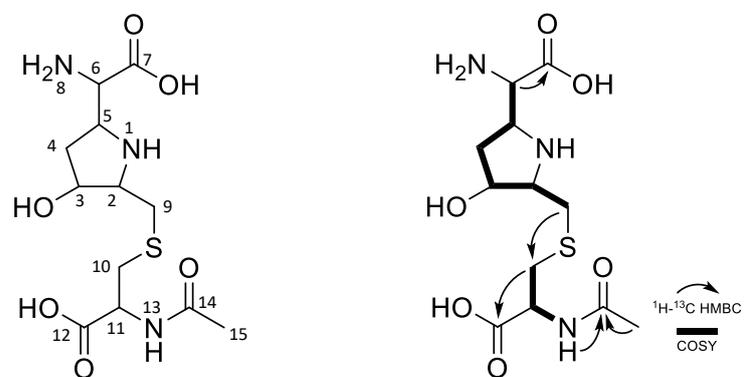
次に s56-p1 のグリシンと DADH 由来骨格間のペプチド結合形成機構に着目した。s56-p1 生合成遺伝子クラスター中には 3 つの *nrps* 遺伝子(*orf6*, *orf8*, *orf29*)がコードされている。各 NRPS のドメイン構造は以下のとおりである: ORF6; A-T, ORF8; A-T-C, ORF29; C-A-T-TE。各 A ドメインの予想基質を前節の表に示した。ORF6 の A ドメイン(ORF6-A)はバリンを基質とすることが予想される一方、ORF8-A の基質認識モチーフは既知ものと相同性を示さず、その基質は予想できなかった。ORF29-A の基質認識モチーフは Vzb7-A と同一であるため、ORF29-A は Vzb7-A と同様に DADH もしくはその誘導体を基質とすると考えられる。

s56-p1 はジペプチド化合物であることからその生合成にはこれら NRPS の関与が予想される。また ORF29 の A ドメインが DADH またはその誘導体を基質とすることから、本 A ドメインの直上の C ドメイン(ORF29-C)が、グリシンと DADH 由来骨格間のペプチド結合形成を担うと考えられる。しかし、ORF29-C のアミノ酸配列を既知の C ドメインのものと比較したところ、活性に必要とされる His モチーフ(HHxxxDG)に相当する配列が ¹⁶⁵PALVCD^{S171}に置換してい

ることが明らかとなった (図 3-3-8)。このことから ORF29-C は C ドメインとして不活性である可能性が考えられ、s56-p1 におけるペプチド結合は C ドメインとは異なる機構により形成される可能性が示唆された。

Vzb24 ホモログをコードしている *orf11* の隣に位置する *orf10* は ATP grasp スーパーファミリーに属するタンパク質をコードしている。本ファミリーのタンパク質は ATP 依存的にカルボキシル基を活性化し、ペプチド結合形成を触媒しうることから、ORF10 が s56-p1 のペプチド結合形成に関与する可能性を考え、前述の方法と同様にして *orf10* を破壊した組換え株 *S. lividans* TK23:: Δ *orf10*cosA/cosB^{hph} を作製した。本破壊株の代謝物を分析したところ、s56-p1 の生産が消失していたことから、ORF10 が s56-p1 の生合成に関与することが示唆された(図 3-3-9a)。一方、*S. lividans* TK23:: Δ *orf10*cosA/cosB^{hph} の代謝物を精査したところ、予想分子式 C₁₄H₂₄N₅O₇S (*m/z* 406.1391 [M+H]⁺) に相当する *m/z* 406.1390 [M+H]⁺を示す新たな化合物 3 が蓄積していることが判明した(図 3-3-9b)。化合物 3 のイオンピークは s56-p1 の MS/MS スペクトル中にも存在したことから、これは s56-p1 の部分構造であることが示唆された。また MS/MS スペクトル中のイオンピークを s56-p1 の構造に帰属したところ、これは s56-p1 からグリシン部分とピロリジン環の水酸基を欠いた構造であることが強く示唆された(図 3-3-10)。ORF29-C が His モチーフを欠くことに加え、*orf10* の破壊により、グリシン部分を欠いたと予想される化合物 3 が蓄積したことから、s56-p1 のペプチド結合は NRPS の C ドメインではなく ATP grasp ファミリータンパク質である ORF10 が担うことが示唆された。加えて、蓄積した化合物 3 のピロリジン環が水酸化されていなかったことから、この水酸基はグリシンとの結合よりも後に導入されると推測される。

orf37-orf44 は多くの細菌に保存された遺伝子クラスターを形成しており、機能的に関連していることが予想される。この遺伝子クラスターが s56-p1 の生合成に関与するか検討するため、 λ Red 組換え酵素を発現した大腸菌を用いて、cosB^{hph} の挿入配列中の *orf37*, *orf38*, *orf39*, *orf40*, *orf41*, *orf43*, 及び *orf44* の各遺伝子に *aac*(3)IV 遺伝子を挿入して破壊した改変コスミドを作製した。これらをそれぞれ cosA と共に *S. lividans* TK23 に導入し、各遺伝子破壊株を作製した。これら破壊株を培養し代謝物を分析したところ、いずれの形質転換体においても s56-p1 の生産能は失われていた (図 3-3-11)。また、化合物 3 の生産能も失われていた一方、化合物 3 から glyoxylate hydrazone ユニットを欠いた化合物 2 の生産能は維持されていた (図 3-3-12、図 3-3-13)。このことから、*orf37-orf44* の遺伝子が、s56-p1 の glyoxylate hydrazone ユニットの生合成に関与する可能性が示唆された。



	δ_C	δ_H	(m, J_H in Hz)
N-1			
2	64.3	3.67	(ddd, 3.6, 6.6, 9.0)
3	69.3	4.45	(m)
4	35.0	1.93*	(m)
		2.49	(ddd, 4.2, 10.8, 15.0)
5	57.2	4.16	(ddd, 4.2, 7.2, 10.8)
6	54.6	4.05	(d, 7.2)
7	169.8		
NH ₂ -8			
9	27.4	2.84	(dd, 9.0, 14.4)
		2.97	(dd, 6.6, 14.4)
10	32.9	2.85	(dd, 8.4, 13.8)
		3.04	(dd, 4.8, 13.8)
11	52.6	4.48	(ddd, 4.8, 7.8, 8.4)
12	174.2		
NH-13		8.33	(d, 7.8)
14	174.4		
15	21.8	1.93	(s)

Solvent: 90% H₂O + 10% D₂O

¹H NMR: 600 MHz, ¹³C NMR: 150 MHz

* δ_H was assigned from HSQC experiments.

図 3-3-7 化合物 2 の構造解析

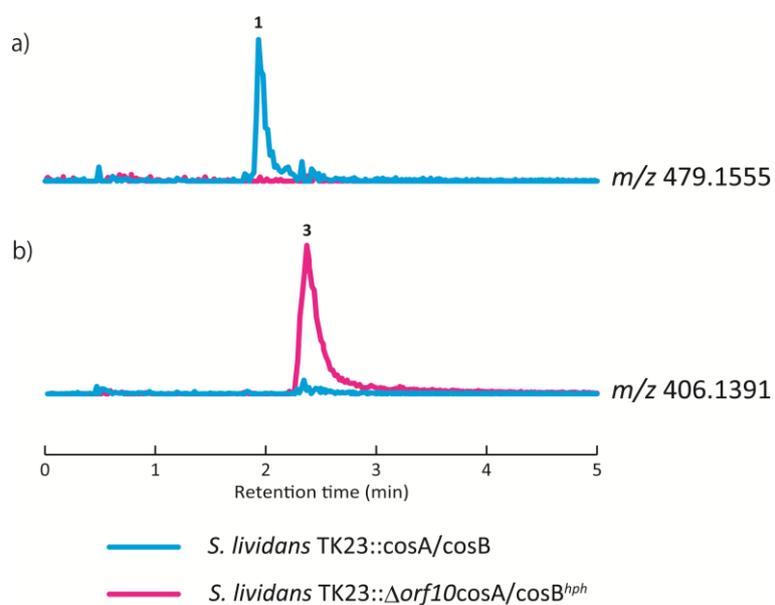


図 3-3-9 *orf10* 破壊株の代謝物分析

a) s56-p1 に相当する m/z 479.1555 の XIC を示した。b) 化合物 3 に相当する m/z 406.1391 の XIC を示した。*orf10* の破壊株において化合物 3 の蓄積が観察された。

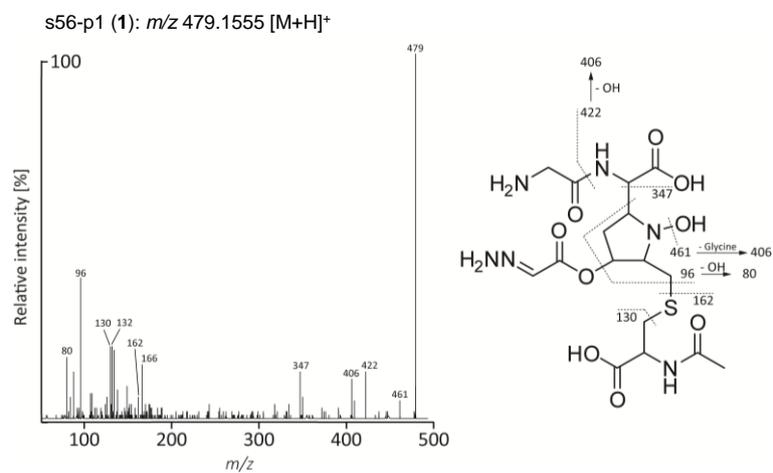


図 3-3-10 s56-p1 の MS/MS スペクトル及びフラグメントの帰属予想

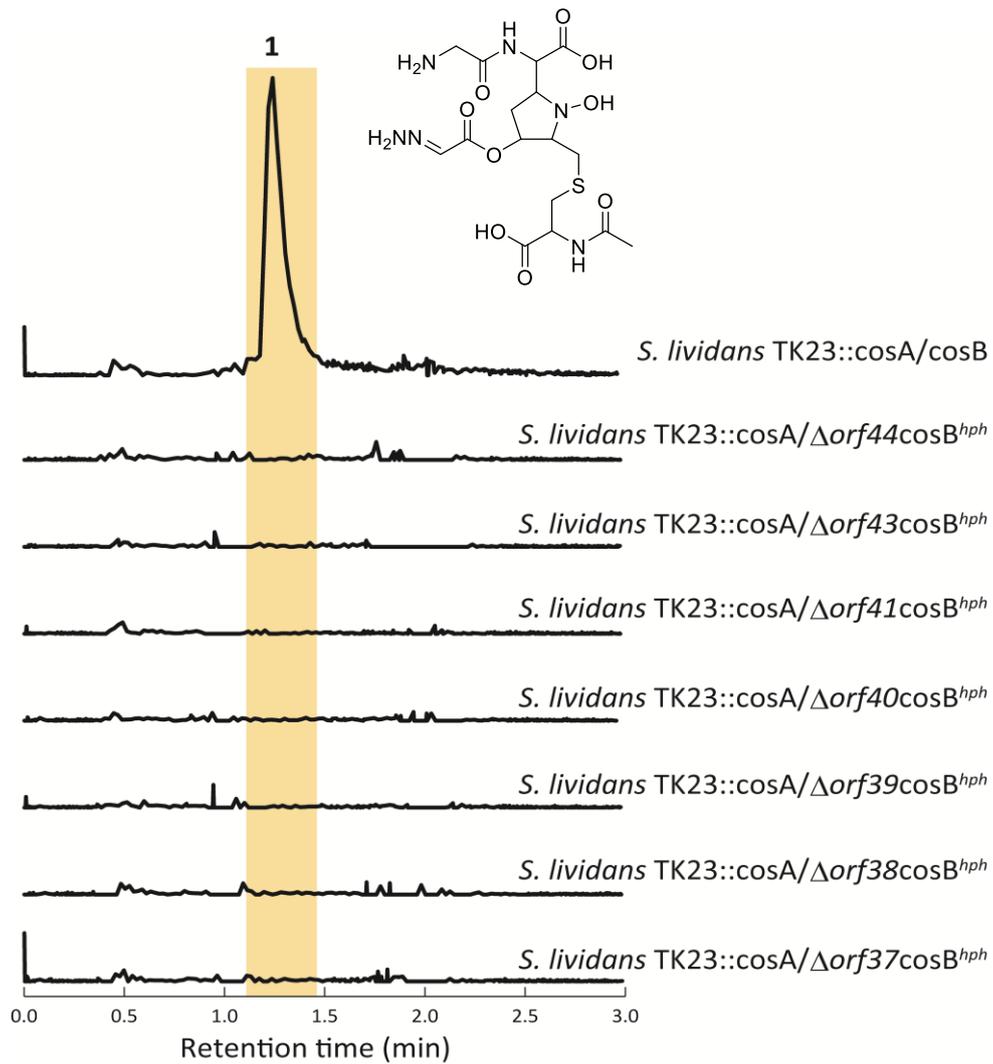


図 3-3-11 細菌に広く保存されたクラスターにコードされた遺伝子 (*orf37-orf44*) の破壊株の代謝物分析
s56-p1 の構造及び、それに相当する m/z 479.1555 の XIC を示した。各遺伝子の破壊により、s56-p1 の生産が消失した。

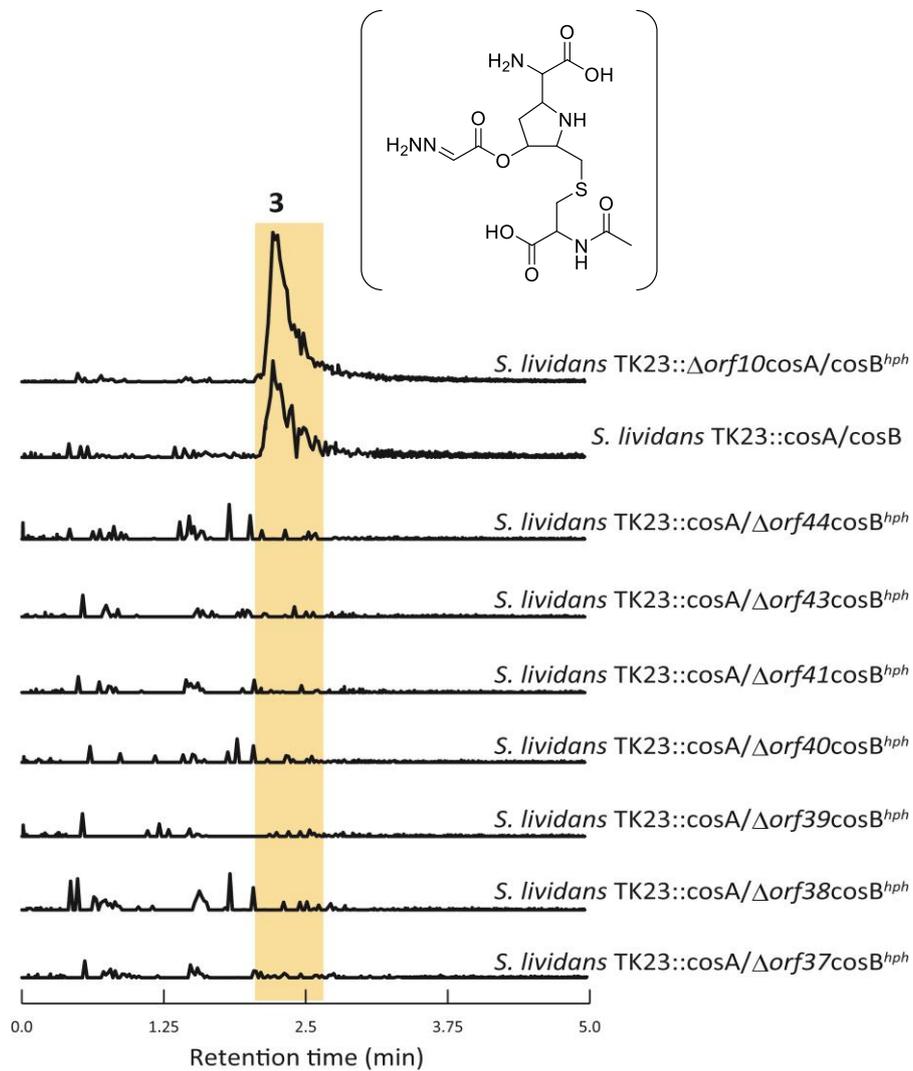


図 3-3-12 細菌に広く保存されたクラスターにコードされた遺伝子 (*orf37-orf44*) の破壊株、及び *orf10* 破壊株の代謝物分析
化合物 3 の予想構造及び、それに相当する m/z 406.1391 の XIC を示した。各遺伝子の破壊株において hydrazone unit を有する化合物 3 の生産は失われた。

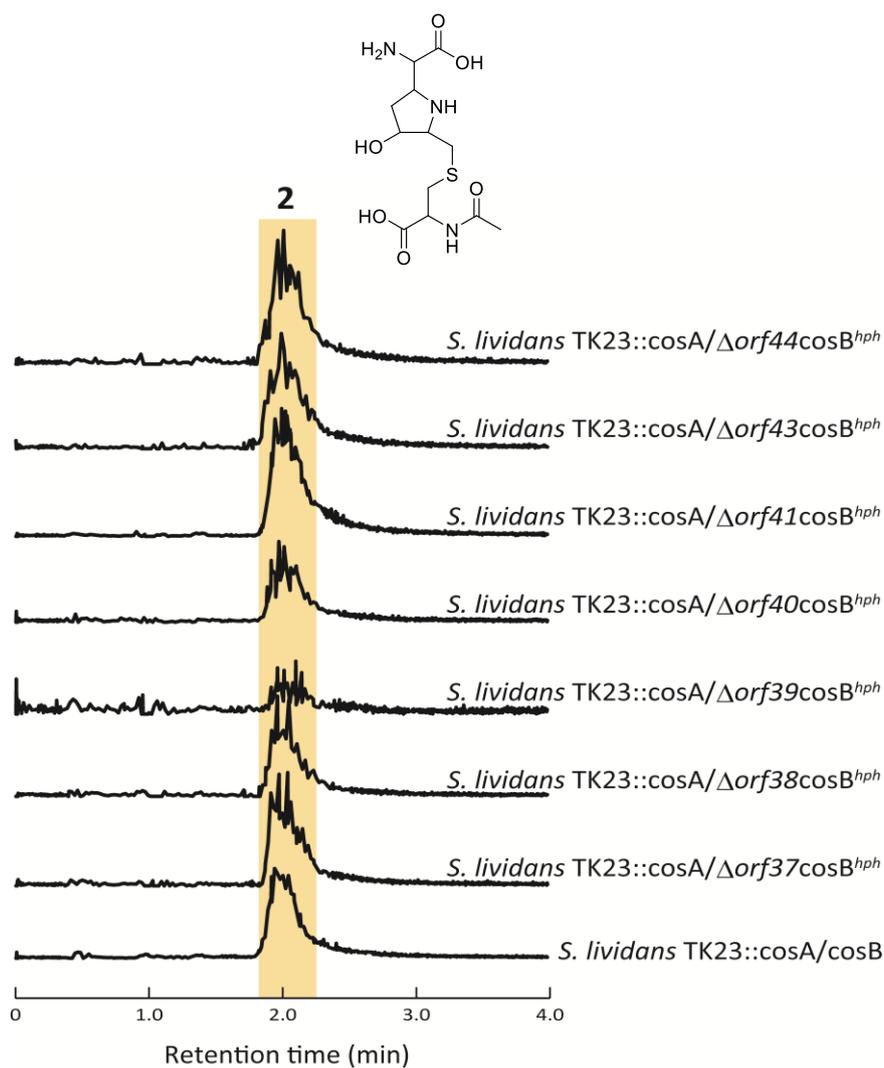


図 3-3-13 細菌に広く保存されたクラスターにコードされた遺伝子 (*orf37-orf44*) の破壊株の代謝物分析
 化合物 2 の構造及び、それに相当する m/z 336.1224 の XIC を示した。各遺伝子の破壊株において s56-p1 の DADH 由来構造である化合物 2 の生産は維持された。

3-4 考察

本節では、前節におけるスクリーニングで見出された AmCP 遺伝子を含む機能未知遺伝子クラスターのうち、*Streptomyces* sp. SoC090715LN-17 由来の遺伝子クラスターの機能解析を行った。本株の AmCP 遺伝子の近傍にはすべての DADH 生合成遺伝子に加え、3つの NRPS をコードする遺伝子が見出されたほか、細菌に広く保存された 8つの *orf* からなる機能未知の遺伝子カセットが存在していた。本遺伝子カセットは既知化合物の遺伝子クラスター中には見出されず、その生合成産物を予想することは困難であったが、その保存性から、機能的に重要な化合物の生合成を担う可能性が予想された。そこで本株においては、近傍に存在するこの遺伝子カセットが AmCP を介した生合成マシナリーと協調して二次代謝産物を生合成する可能性を予想し、異種放線菌宿主における遺伝子クラスターの異種発現系を基盤とした機能解析を試みた。全長約 70 kb の遺伝子領域を 2 種類の和合性コスミドベクターを用いてクローニングし、これらを異種放線菌 *S. lividans* TK23 に導入して、遺伝子クラスター全体を宿主内で再構成した。本形質転換体の代謝物を分析したところ、新たな化合物 s56-p1 の生産を確認した。興味深いことに本化合物は親株である *Streptomyces* sp. SoC090715LN-17 の代謝物中にも確認された。このことから、異種放線菌に導入した約 70 kb の DNA 断片に s56-p1 の全生合成遺伝子がコードされていることが明らかとなった。また、AmCP に基質グルタミン酸を結合する機能を担う Vzb23 ホモログである ORF5 遺伝子を破壊した改変コスミドを作製し、これを導入した破壊株 *S. lividans* TK23:: $\Delta orf5$ cosA/cosB^{hph} の代謝物を分析したところ、s56-p1 の生産は失われていた。このことから s56-p1 は AmCP を介した機構により生合成されることが明らかとなった。

親株における s56-p1 の生産量は微量であり、代謝物の解析だけからその生産を検知することは難しかったが、標的遺伝子クラスターを導入した異種放線菌宿主において新たに生産された化合物の分析を介して初めてその存在に着目することができた。これは近年データベースに蓄積しつつある機能未知の遺伝子クラスターの解析において、異種放線菌宿主による発現系の一定の有効性を示すものである。本研究でみられた異種放線菌宿主における目的化合物の生産量増加のメカニズムは今のところ定かではないが、例えば異種放線菌宿主において前駆体の供給が增強されたことなどが考えられる。今後微生物ゲノム中に多様に存在する機能未知遺伝子クラスターの効率的な解析を目指す上で、異種発現はやはり有効な手段のひとつであると考えられる。

s56-p1 を単離精製し、¹H-¹⁵N HMBC を含む各種 NMR 測定により構造解析を行った。その結果、s56-p1 はグリシンと DADH 由来骨格からなるジペプチド

であり、DADH 由来骨格に含まれるピロリジン環は、水酸基及び *N*-アセチルシステインのほか、天然物では前例のない glyoxylate hydrazone ユニットによって高度に修飾されていることが明らかとなった。s56-p1 の構造は AmCP を介して生合成される vazabotide A や、AmCP を介して生合成されることが強く示唆される azinomycin B 及び ficellomycin と比較して大きく異なっており、特異な官能基を有していた(図 3-4-1)。これにより、AmCP を介して生合成される天然化合物の構造多様性の一端を示されるとともに、その構造多様性は NRPS によって縮合されるアミノ酸の種類によってだけでなく DADH 由来骨格を母核としたが様々な修飾によって創出されることが明らかとなった。AmCP を介した生合成マシナリーは構造多様化の母核の生合成マシナリーであるといえ、このことは新規性の高い天然化合物を探索するうえで AmCP 遺伝子が優れた指標となることを表している。今後本研究で見出された AmCP 遺伝子を含む他の遺伝子クラスターの解析により、DADH 母核修飾構造の多様性がさらに拡充されることが期待される。

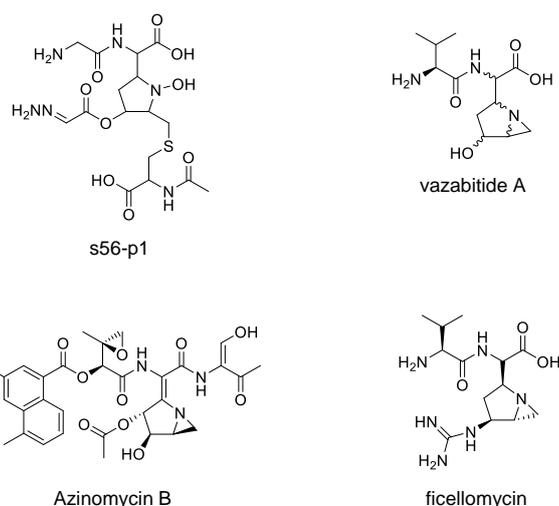


図 3-4-1 AmCP を介して生合成される天然化合物の構造多様性

AmCP を介して生合成される s56-p1, vazabotide A および AmCP を介して生合成されることが強く示唆されている azinomycin B, ficellomycin の構造を示した。

s56-p1 の生合成遺伝子クラスター中にはすべての DADH 生合成遺伝子ホモログのほか、vazabotide A 生合成遺伝子クラスター(vzb クラスター)に共通する遺伝子が複数見出された(*orf13*, “vzb20”; *orf14*, “vzb19”; *orf15*, “vzb18”; *orf25*, “vzb10”; *orf26*, “vzb11”; *orf27*, “vzb21”; *orf29*, “vzb7”; *orf30*, “vzb6”; *orf31*, “vzb5”)。これらの遺伝子はいずれもそのホモログが azinomycin B 生合成遺伝子クラスター(*azi* クラスター)にも共通して存在することから、vazabotide A や azinomycin B の特徴的なアザビシクロ環の形成に参与することが予想されていた(平成 25 年度 長谷部文人 博士論文)。さらに Vzb21 が DADH に対して PAPS を供与体として硫酸基を転移する活性を有することが明らかとなった(平成 27 年度 長谷部文人 農芸化学会)。また ORF29-C は縮合反応を触媒したことが示唆されたため、DADH 由来骨格は ORF29-PCP 上での環形成の後、ORF29-TE によって PCP から切り離されると考えられる。以上のことから予想されるアザビシクロ環形成経路を図 3-4-2 に示した。

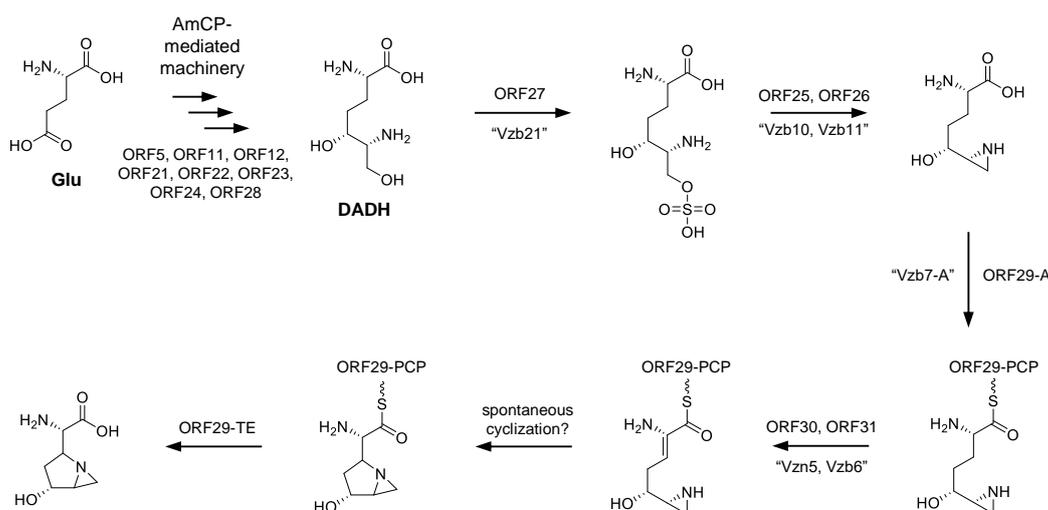


図 3-4-2 アザビシクロ環を含むアミノ酸の予想生合成経路

本研究で取得した *cosA* 及び *cosB* には DADH 生合成遺伝子及び *vzb* クラスターと *azi* クラスターに共通する遺伝子のホモログが全て含まれている。しかしこれらを導入した形質転換体の代謝物中にはアザビシクロ環含有化合物は見出されない一方、ピロリジン環に *N*-アセチルシステインが付加した s56-p1、化合物 2, 3 (等)が蓄積した。*N*-アセチルシステインは複数の天然物に共通してみられる部分構造であり(73-76)(図 3-4-3)、Mycothioliol (MSH)を介した解毒代謝経路により付加されることが知られている(77)。MSH は放線菌細胞内に存在する低

分子チオールであり、求電子性のアルキル化剤などの毒素と共有結合して無毒化する機能を担う(78,79)。MSHは1D-myo-inositol-2-amino-2-deoxylglucopyranoside (Glc-Ins)に*N*-アセチルシステインがペプチド結合によりつながった構造を有しており(80,81)、そのチオール基が求電子剤と共有結合を形成する。これにより形成されたMSH-*S*-conjugateはその後ペプチダーゼ Mcaにより加水分解され、Glc-Ins部分が脱離する。*N*-アセチルシステインが付加して不活化した化合物は排出機構により細胞外に放出される。一方、本章で対象とした遺伝子クラスターによって形成されると考えられるアザビシクロ環はDNAのアルキル化活性の**活性本体として機能する**。azinomycin Bではアザビシクロ環が開環することで核酸のアデニン塩基のN7原子と共有結合したピロリジン環が生じる(図3-4-4)(42,43)。本研究により見出されたs56-p1、化合物2、化合物3はいずれも求核攻撃を受けて開環したアザビシクロ環に一致する構造を有していることから、これらはアザビシクロ環がMSH依存的な解毒代謝経路により修飾を受けた化合物であると推測している。

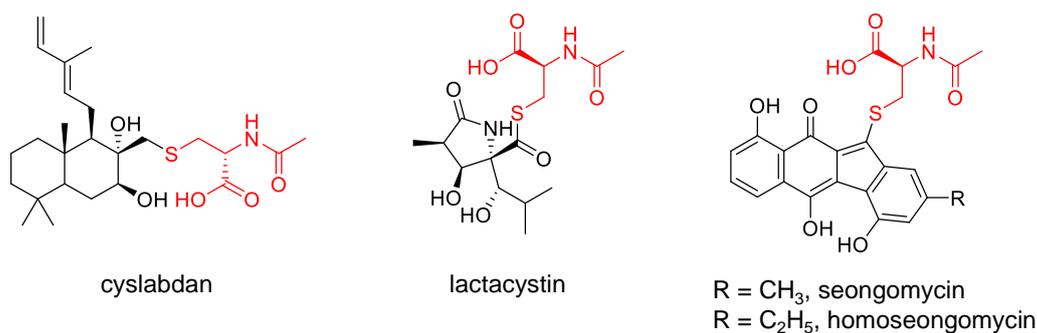


図3-4-3 *N*-アセチルシステインを含む化合物の例

N-アセチルシステイン残基を赤色で示した。

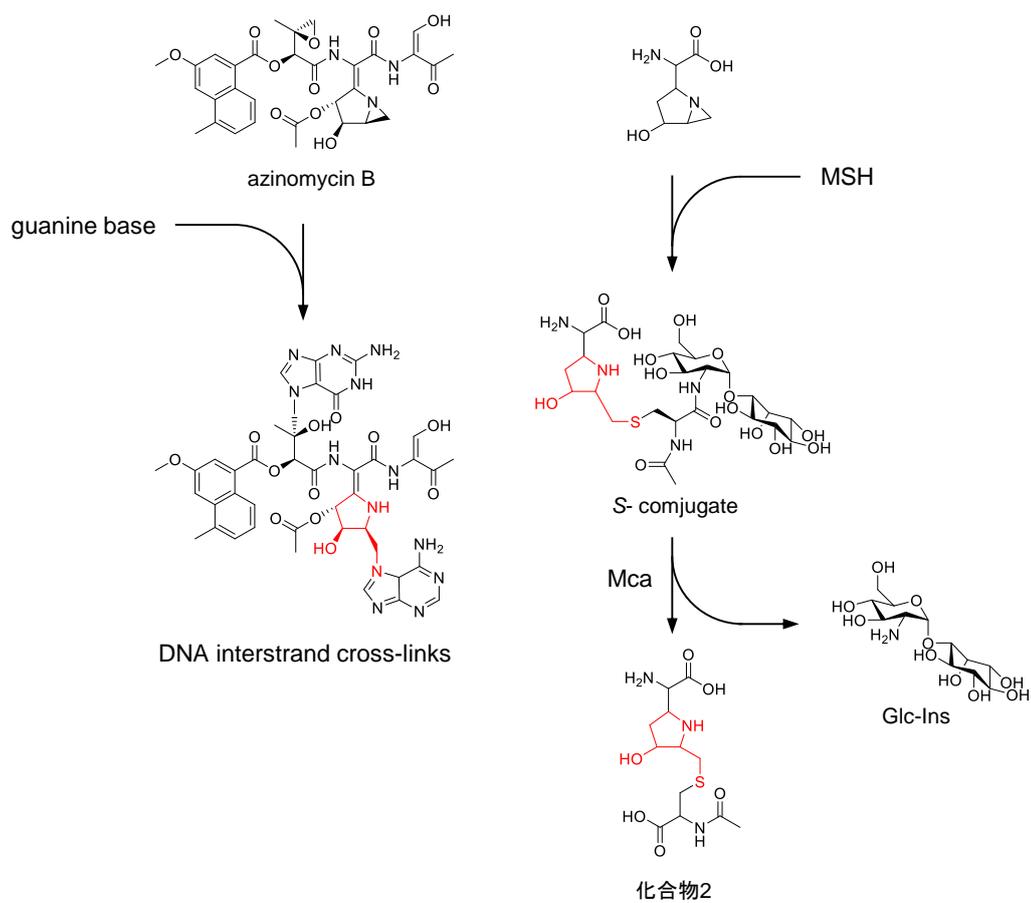


図 3-4-4 azinomycin B における DNA アルキル化反応と
 本研究における MSH を介した化合物 2 の予想生成機構
 アザピシクロ環が求核攻撃を受けて生じたピロリジン環を赤色で示した。

s56-p1 生合成遺伝子クラスター中の ATP-grasp ファミリーのタンパク質をコードしている ORF10 遺伝子を破壊したところ、s56-p1 の生産は失われる一方、s56-p1 からグリシンと *N*-水酸基を欠いたものと予想される化合物 3 が新たに蓄積した。ATP grasp ファミリーのタンパク質は ATP 依存的にペプチド結合を形成しうることから、s56-p1 におけるグリシンと DADH 由来骨格間のペプチド結合は NRPS によってではなく、ORF10 によって形成されるものと考えられる。実際、NRPS である ORF29 の C ドメインは縮合反応に必要な His モチーフを欠いており、ORF29 にロードされた DADH 骨格と他の NRPS にロードされたアミノ酸骨格間の縮合反応を触媒しないことが示唆される。一方、スクリーニングによって見出された他の遺伝子クラスターに見出される ORF29 のホモログ(GE-03_NRPS1, JE-04_NRPS2)の C ドメインは His モチーフを有していたことから、これらは Vzb7 と同様に近傍の NRPS と協調して DADH 骨格を含むペプチド性化合物を生合成すると考えられる。DADH 由来アミノ酸と他のアミノ酸を NRPS ではなく、サイズの小さい ATP grasp ファミリーのタンパク質によって縮合する機構は s56-p1 の生合成特有のものと考えられる。今後 ORF10 のエンジニアリングにより基質特異性を人為的に改変することで、DADH 由来骨格とグリシン以外のアミノ酸が結合した類縁体創成への応用が期待できるかもしれない。

s56-p1 生合成遺伝子クラスター中の *orf37*, *orf38*, *orf39*, *orf40*, *orf41*, *orf43*, *orf44* のいずれの破壊によっても化合物 2 の生産能は維持された一方、化合物 2 に glyoxylate hydrazone ユニットが付加したと思われる化合物 3 の生産能は失われた。*orf38* は L-lysine 6-monooxygenase とアノテーションされるタンパク質をコードしており、ornithine *N*-hydroxylase である KtzI と 32% の相同性を有している。KtzI は Kutzneride の部分構造である環状ヒドラジン骨格を含む非タンパク性アミノ酸 Piperazic acid の生合成の初発反応を担っている。KtzI により生成した *N*^ε-hydroxy ornithine から Piperazic acid への変換反応は明らかにされていないが、N 原子の酸化反応は N-N 結合の形成において不可欠な初発反応であることが示されている。これらのことから *orf38* が s56-p1 における N-N 結合形成に関与する可能性が考えられ、また周辺の領域の保存性から、*orf37-orf44* は glyoxylate hydrazone ユニットの生合成に関与する可能性が考えられる。

以上の事柄を踏まえ、s56-p1 の生合成経路を予想した (図 3-4-5)。AmCP を介して生合成された DADH は、vzb,azi クラスターに共通する酵素ホモログにより変換され、ORF29 の PCP ドメイン上でアザビシクロ環が形成される。生じたアザビシクロ環を含むアミノ酸骨格は他のアミノ酸骨格と縮合されることなく NRPS から切り離され、ORF37-ORF44 を含む酵素群によって生合成さ

れた glyoxylate hydrazone ユニットと未知の機構によって縮合する。さらに ORF10 によってグリシンと結合して化合物 4 が生じたのち、MSH 依存的な代謝経路によって *N*-アセチルシステインが付加される。*orf7* は水酸化を含む多様な酸化還元反応を触媒するシトクロム P450 スーパーファミリーに属するタンパク質をコードしており、ピロリジン環の N 原子水酸化を触媒する機能を有するかもしれない。各遺伝子破壊株で確認された化合物 2 及び化合物 3 は、蓄積したアザビシクロ環を含む生合成中間体が化合物 4 と同様にして MSH 修飾及び加水分解により生じたものと考えられる。

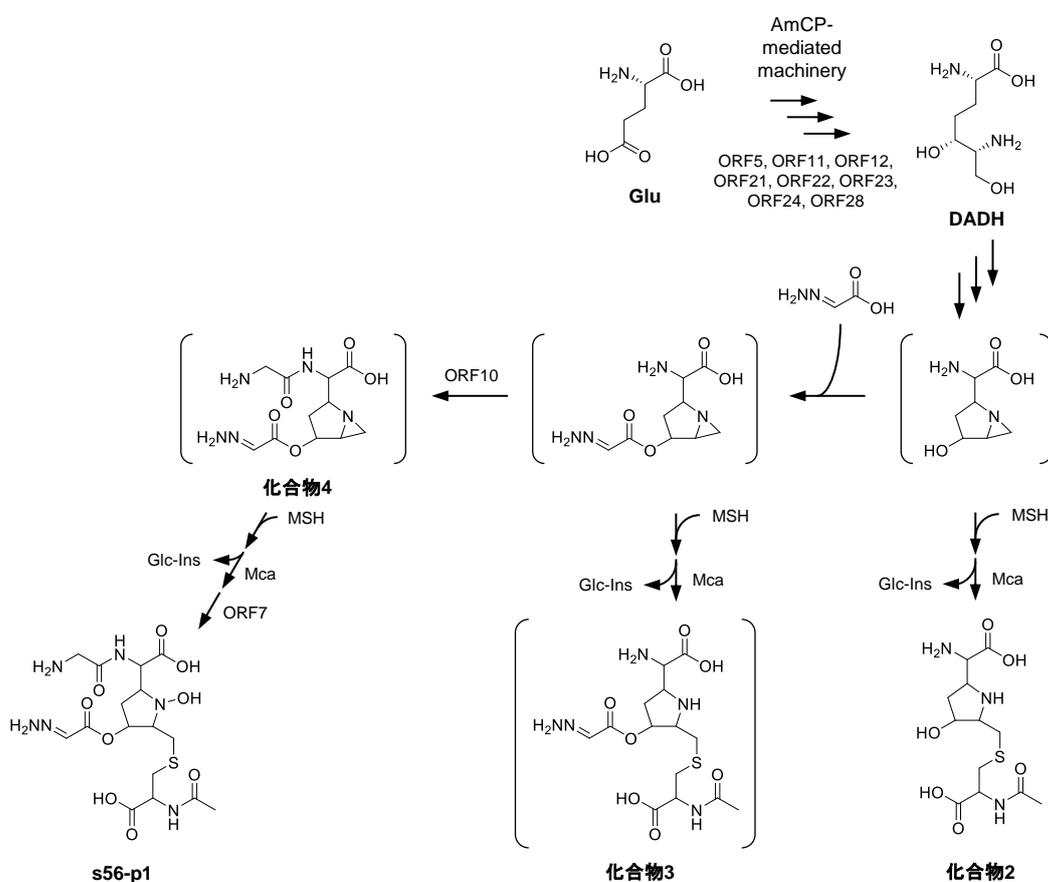


図 3-4-5 s56-p1 の予想生合成経路

第4章 インターネット公表できないため削除

第5章 インターネット公表できないため削除

参考文献

1. Solecki, R. S. (1975) SHANIDAR-4, A NEANDERTHAL FLOWER BURIAL IN NORTHERN IRAQ. *Science* **190**, 880-881
2. Ji, H. F., Li, X. J., and Zhang, H. Y. (2009) Natural products and drug discovery Can thousands of years of ancient medical knowledge lead us to new and powerful drug combinations in the fight against cancer and dementia? *Embo Reports* **10**, 194-200
3. Fleming, A. (1929) ON THE ANTIBACTERIAL ACTION OF CULTURES OF A PENICILLIUM, WITH SPECIAL REFERENCE TO THEIR USE IN THE ISOLATION OF B. INFLUENZAE. *British Journal of Experimental Pathology* **10**, 226-236
4. Schatz, A., Bugie, E., and Waksman, S. A. (1944) Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against gram positive and gram-negative bacteria. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **55**, 66-69
5. Lewis, K. (2012) Recover the lost art of drug discovery. *Nature* **485**, 439-440
6. Payne, D. J., Gwynn, M. N., Holmes, D. J., and Pompliano, D. L. (2007) Drugs for bad bugs: confronting the challenges of antibacterial discovery. *Nature Reviews Drug Discovery* **6**, 29-40
7. Galloway, W., Isidro-Llobet, A., and Spring, D. R. (2010) Diversity-oriented synthesis as a tool for the discovery of novel biologically active small molecules. *Nature Communications* **1**, 13
8. Newman, D. J., and Cragg, G. M. (2016) Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products* **79**, 629-661
9. Bentley, S. D., Chater, K. F., Cerdeno-Tarraga, A. M., Challis, G. L., Thomson, N. R., James, K. D., Harris, D. E., Quail, M. A., Kieser, H., Harper, D., Bateman, A., Brown, S., Chandra, G., Chen, C. W., Collins, M., Cronin, A., Fraser, A., Goble, A., Hidalgo, J., Hornsby, T., Howarth, S., Huang, C. H., Kieser, T., Larke, L., Murphy, L., Oliver, K., O'Neil, S., Rabinowitsch, E., Rajandream, M. A., Rutherford, K., Rutter, S., Seeger, K., Saunders, D., Sharp, S., Squares, R., Squares, S., Taylor, K., Warren, T., Wietzorrek, A., Woodward, J., Barrell, B. G., Parkhill, J., and Hopwood, D. A. (2002) Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature* **417**, 141-147
10. Gatewood, M. L., Bralley, P., Weil, M. R., and Jones, G. H. (2012) RNA-Seq and RNA Immunoprecipitation Analyses of the Transcriptome of *Streptomyces coelicolor* Identify Substrates for RNase III. *Journal of Bacteriology* **194**, 2228-2237
11. Milshteyn, A., Schneider, J. S., and Brady, S. F. (2014) Mining the Metabiome:

- Identifying Novel Natural Products from Microbial Communities. *Chemistry & Biology* **21**, 1211-1223
12. Wilson, M. C., Mori, T., Ruckert, C., Uria, A. R., Helf, M. J., Takada, K., Gernert, C., Steffens, U. A. E., Heycke, N., Schmitt, S., Rinke, C., Helfrich, E. J. N., Brachmann, A. O., Gurgui, C., Wakimoto, T., Kracht, M., Crusemann, M., Hentschel, U., Abe, I., Matsunaga, S., Kalinowski, J., Takeyama, H., and Piel, J. (2014) An environmental bacterial taxon with a large and distinct metabolic repertoire. *Nature* **506**, 58+
 13. Medema, M. H., and Fischbach, M. A. (2015) Computational approaches to natural product discovery. *Nature Chemical Biology* **11**, 639-648
 14. Doroghazi, J. R., Albright, J. C., Goering, A. W., Ju, K. S., Haines, R. R., Tchalukov, K. A., Labeda, D. P., Kelleher, N. L., and Metcalf, W. W. (2014) A roadmap for natural product discovery based on large-scale genomics and metabolomics. *Nature Chemical Biology* **10**, 963-968
 15. Skinnider, M. A., Johnston, C. W., Edgar, R. E., Dejong, C. A., Merwin, N. J., Rees, P. N., and Magarvey, N. A. (2016) Genomic charting of ribosomally synthesized natural product chemical space facilitates targeted mining. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **113**, E6343-E6351
 16. Mercer, A. C., and Burkart, M. D. (2007) The ubiquitous carrier protein - a window to metabolite biosynthesis. *Natural Product Reports* **24**, 750-773
 17. Crosby, J., and Crump, M. P. (2012) The structural role of the carrier protein - active controller or passive carrier. *Natural Product Reports* **29**, 1111-1137
 18. Evans, S. E., Williams, C., Arthur, C. J., Ploskon, E., Wattana-Amorn, P., Cox, R. J., Crosby, J., Willis, C. L., Simpson, T. J., and Crump, M. P. (2009) Probing the Interactions of Early Polyketide Intermediates with the Actinorhodin ACP from *S. coelicolor* A3(2). *Journal of Molecular Biology* **389**, 511-528
 19. Fujita, S. C., Oshima, T., and Imahori, K. (1976) PURIFICATION AND PROPERTIES OF D-GLYCERALDEHYDE-3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE FROM AN EXTREME THERMOPHILE, THERMUS-THERMOPHILUS STRAIN HB-8. *European Journal of Biochemistry* **64**, 57-68
 20. Chatterjee, S. P., Singh, B. K., and Gilvarg, C. (1994) BIOSYNTHESIS OF LYSINE IN PLANTS - THE PUTATIVE ROLE OF MESO-DIAMINOPIMELATE DEHYDROGENASE. *Plant Molecular Biology* **26**, 285-290
 21. Vogel, H. J. (1964) DISTRIBUTION OF LYSINE PATHWAYS AMONG FUNGI - EVOLUTIONARY IMPLICATIONS. *American Naturalist* **98**, 435-446
 22. Storts, D. R., and Bhattacharjee, J. K. (1985) PURIFICATION AND PROPERTIES OF ALPHA AMINOADIPATE SEMIALDEHYDE DEHYDROGENASE EC-1.2.1.31

- AND SACCHAROPINE DEHYDROGENASE GLUTAMATE-FORMING EC-1.5.1.10 FROM SACCHAROMYCES-CEREVISIAE. *Abstracts of the Annual Meeting of the American Society for Microbiology* **85**, 174-174
23. Kuo, M. H., Broquist, H. P., and Saunders, P. P. (1964) LYSINE BIOSYNTHESIS IN YEAST - NEW METABOLITE OF ALPHA-AMINOADIPIC ACID. *Journal of Biological Chemistry* **239**, 508-&
 24. Nishiyama, M., Kukimoto, M., Beppu, T., and Horinouchi, S. (1995) AN OPERON ENCODING ASPARTOKINASE AND PURINE PHOSPHORIBOSYLTRANSFERASE IN THERMUS-FLAVUS. *Microbiology-Uk* **141**, 1211-1219
 25. Kobashi, N., Nishiyama, M., and Tanokura, M. (1999) Aspartate kinase-independent lysine synthesis in an extremely thermophilic bacterium, *Thermus thermophilus*: Lysine is synthesized via alpha-aminoadipic acid not via diaminopimelic acid. *Journal of Bacteriology* **181**, 1713-1718
 26. Nishida, H., Nishiyama, M., Kobashi, N., Kosuge, T., Hoshino, T., and Yamane, H. (1999) A prokaryotic gene cluster involved in synthesis of lysine through the amino adipate pathway: A key to the evolution of amino acid biosynthesis. *Genome Research* **9**, 1175-1183
 27. Miyazaki, J., Kobashi, N., Nishiyama, M., and Yamane, H. (2001) Functional and evolutionary relationship between arginine biosynthesis and prokaryotic lysine biosynthesis through alpha-aminoadipate. *Journal of Bacteriology* **183**, 5067-5073
 28. Miyazaki, J., Kobashi, N., Nishiyama, M., and Yamane, H. (2003) Characterization of homoisocitrate dehydrogenase involved in lysine biosynthesis of an extremely thermophilic bacterium, *Thermus thermophilus* HB27, and evolutionary implication of beta-decarboxylating dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 1864-1871
 29. Miyazaki, T., Miyazaki, J., Yamane, H., and Nishiyama, M. (2004) alpha-Amino adipate aminotransferase from an extremely thermophilic bacterium, *Thermus thermophilus*. *Microbiology-Sgm* **150**, 2327-2334
 30. Wulandari, A. P., Miyazaki, J., Kobashi, N., Nishiyama, M., Hoshino, T., and Yamane, H. (2002) Characterization of bacterial homocitrate synthase involved in lysine biosynthesis. *Febs Letters* **522**, 35-40
 31. Miyazaki, J., Kobashi, N., Fujii, T., Nishiyama, M., and Yamane, H. (2002) Characterization of a lysK gene as an argE homolog in *Thermus thermophilus* HB27. *Febs Letters* **512**, 269-274
 32. Jia, Y. H., Tomita, T., Yamauchi, K., Nishiyama, M., and Palmer, D. R. J. (2006)

- Kinetics and product analysis of the reaction catalysed by recombinant homoaconitase from *Thermus thermophilus*. *Biochemical Journal* **396**, 479-485
33. Kang, W. K., Icho, T., Isono, S., Kitakawa, M., and Isono, K. (1989) CHARACTERIZATION OF THE GENE RIMK RESPONSIBLE FOR THE ADDITION OF GLUTAMIC-ACID RESIDUES TO THE C-TERMINUS OF RIBOSOMAL PROTEIN-S6 IN *ESCHERICHIA-COLI-K12*. *Molecular & General Genetics* **217**, 281-288
 34. Horie, A., Tomita, T., Saiki, A., Kono, H., Taka, H., Mineki, R., Fujimura, T., Nishiyama, C., Kuzuyama, T., and Nishiyama, M. (2009) Discovery of proteinaceous N-modification in lysine biosynthesis of *Thermus thermophilus*. *Nature Chemical Biology* **5**, 673-679
 35. Yoshida, A., Tomita, T., Fujimura, T., Nishiyama, C., Kuzuyama, T., and Nishiyama, M. (2015) Structural insight into amino group-carrier protein-mediated lysine biosynthesis: crystal structure of the LysZ · LysW complex from *Thermus thermophilus*. *Journal of Biological Chemistry* **290**, 435-447
 36. Shimizu, T., Tomita, T., Kuzuyama, T., and Nishiyama, M. (2016) Crystal Structure of the LysY.LysW Complex from *Thermus thermophilus*. *Journal of Biological Chemistry* **291**, 9948-9959
 37. Ouchi, T., Tomita, T., Horie, A., Yoshida, A., Takahashi, K., Nishida, H., Lassak, K., Taka, H., Mineki, R., Fujimura, T., Kosono, S., Nishiyama, C., Masui, R., Kuramitsu, S., Albers, S.-V., Kuzuyama, T., and Nishiyama, M. (2013) Lysine and arginine biosyntheses mediated by a common carrier protein in *Sulfolobus*. *Nature Chemical Biology* **9**, 277-283
 38. Hasebe, F., Matsuda, K., Shiraishi, T., Futamura, Y., Nakano, T., Tomita, T., Ishigami, K., Taka, H., Mineki, R., Fujimura, T., Osada, H., Kuzuyama, T., and Nishiyama, M. (2016) Amino-group carrier-protein-mediated secondary metabolite biosynthesis in *Streptomyces*. *Nature Chemical Biology* **12**, 967-+
 39. Nagaoka, K., Matsumoto, M., Oono, J., Yokoi, K., Ishizeki, S., and Nakashima, T. (1986) AZINOMYCIN-A AND AZINOMYCIN-B, NEW ANTITUMOR ANTIBIOTICS .1. PRODUCING ORGANISM, FERMENTATION, ISOLATION, AND CHARACTERIZATION. *Journal of Antibiotics* **39**, 1527-1532
 40. Yokoi, K., Nagaoka, K., and Nakashima, T. (1986) AZINOMYCIN-A AND ANZINOMYCIN-B, NEW ANTITUMOR ANTIBIOTICS .2. CHEMICAL STRUCTURES. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **34**, 4554-4561
 41. Kuo, M. S., Yurek, D. A., and Mizesak, S. A. (1989) STRUCTURE ELUCIDATION OF FICELLOMYCIN. *Journal of Antibiotics* **42**, 357-360

42. Foulke-Abel, J., Agbo, H., Zhang, H. T., Mori, S., and Watanabe, C. M. H. (2011) Mode of action and biosynthesis of the azabicyclic-containing natural products azinomycin and ficellomycin. *Natural Product Reports* **28**, 693-704
43. Fujiwara, T., Saito, I., and Sugiyama, H. (1999) Highly efficient DNA interstrand crosslinking induced by an antitumor antibiotic, carzinophilin. *Tetrahedron Letters* **40**, 315-318
44. Zhao, Q., He, Q., Ding, W., Tang, M., Kang, Q., Yu, Y., Deng, W., Zhang, Q., Fang, J., Tang, G., and Liu, W. (2008) Characterization of the azinomycin B biosynthetic gene cluster revealing a different iterative type I polyketide synthase for naphthoate biosynthesis. *Chemistry & Biology* **15**, 693-705
45. Kartal, B., Maalcke, W. J., de Almeida, N. M., Cirpus, I., Gloerich, J., Geerts, W., den Camp, H., Harhangi, H. R., Janssen-Megens, E. M., Francoijs, K. J., Stunnenberg, H. G., Keltjens, J. T., Jetten, M. S. M., and Strous, M. (2011) Molecular mechanism of anaerobic ammonium oxidation. *Nature* **479**, 127-U159
46. Risgaard-Petersen, N., Nielsen, L. P., Rysgaard, S., Dalsgaard, T., and Meyer, R. L. (2004) Application of the isotope pairing technique in sediments where anammox and denitrification co-exist (vol 1, pg 63, 2003). *Limnology and Oceanography-Methods* **2**, 315-315
47. Trimmer, M., Engstrom, P., and Thamdrup, B. (2013) Stark Contrast in Denitrification and Anammox across the Deep Norwegian Trench in the Skagerrak. *Applied and Environmental Microbiology* **79**, 7381-7389
48. Blair, L. M., and Sperry, J. (2013) Natural Products Containing a Nitrogen-Nitrogen Bond. *Journal of Natural Products* **76**, 794-812
49. Heinecke, C. L., and Melander, C. (2010) Analysis of kinamycin D-mediated DNA cleavage. *Tetrahedron Letters* **51**, 1455-1458
50. Colis, L. C., Woo, C. M., Hegan, D. C., Li, Z. W., Glazer, P. M., and Herzon, S. B. (2014) The cytotoxicity of (-)-lomaiviticin A arises from induction of double-strand breaks in DNA. *Nature Chemistry* **6**, 504-510
51. Taguchi, A., Nishiguchi, S., Shiozuka, M., Nomoto, T., Ina, M., Nojima, S., Matsuda, R., Nonomura, Y., Kiso, Y., Yamazaki, Y., Yakushiji, F., and Hayashi, Y. (2012) Negamycin Analogue with Readthrough-Promoting Activity as a Potential Drug Candidate for Duchenne Muscular Dystrophy. *Acs Medicinal Chemistry Letters* **3**, 118-122
52. Knoll, L. J., Schall, O. F., Suzuki, I., Gokel, G. W., and Gordon, J. I. (1995) COMPARISON OF THE REACTIVITY OF TETRADECENOIC ACIDS, A TRIACIN, AND UNSATURATED OXIMES WITH 4 PURIFIED

- SACCHAROMYCES-CEREVISIAE FATTY-ACID ACTIVATION PROTEINS. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 20090-20097
53. Zhang, Q. B., Mandi, A., Li, S. M., Chen, Y. C., Zhang, W. J., Tian, X. P., Zhang, H. B., Li, H. X., Zhang, W. M., Zhang, S., Ju, J. H., Kurtan, T., and Zhang, C. S. (2012) N-N-Coupled Indolo-sesquiterpene Atropo-Diastereomers from a Marine-Derived Actinomycete. *European Journal of Organic Chemistry*, 5256-5262
54. Raju, B., Mortell, K., Anandan, S., O'Dowd, H., Gao, H. W., Gomez, M., Hackbarth, C., Wu, C., Wang, W., Yuan, Z. Y., White, R., Trias, J., and Patel, D. (2003) N- and C-terminal modifications of negamycin. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **13**, 2413-2418
55. Garg, R. P., Ma, Y. Q., Hoyt, J. C., and Parry, R. J. (2002) Molecular characterization and analysis of the biosynthetic gene cluster for the azoxy antibiotic valanimycin. *Molecular Microbiology* **46**, 505-517
56. Waldman, A. J., Pechersky, Y., Wang, P., Wang, J. X., and Balskus, E. P. (2015) The Cremeomycin Biosynthetic Gene Cluster Encodes a Pathway for Diazo Formation. *ChemBiochem* **16**, 2172-2175
57. Fujimori, D. G., Hrvatin, S., Neumann, C. S., Strieker, M., Marahiel, M. A., and Walsh, C. T. (2007) Cloning and characterization of the biosynthetic gene cluster for kutznerides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 16498-16503
58. Gould, S. J., Hong, S. T., and Carney, J. R. (1998) Cloning and heterologous expression of genes from the kinamycin biosynthetic pathway of *Streptomyces murayamaensis*. *Journal of Antibiotics* **51**, 50-57
59. Bunet, R., Song, L. J., Mendes, M. V., Corre, C., Hotel, L., Rouhier, N., Framboisier, X., Leblond, P., Challis, G. L., and Aigle, B. (2011) Characterization and Manipulation of the Pathway-Specific Late Regulator AlpW Reveals *Streptomyces ambofaciens* as a New Producer of Kinamycins. *Journal of Bacteriology* **193**, 1142-1153
60. Kersten, R. D., Lane, A. L., Nett, M., Richter, T. K. S., Duggan, B. M., Dorrestein, P. C., and Moore, B. S. (2013) Bioactivity-Guided Genome Mining Reveals the Lomaiviticin Biosynthetic Gene Cluster in *Salinispora tropica*. *ChemBiochem* **14**, 955-962
61. Gao, J. T., Ju, K. S., Yu, X. M., Velasquez, J. E., Mukherjee, S., Lee, J., Zhao, C. M., Evans, B. S., Doroghazi, J. R., Metcalf, W. W., and van der Donk, W. A. (2014) Use of a Phosphonate Methyltransferase in the Identification of the Fosfazinomycin Biosynthetic Gene Cluster. *Angewandte Chemie-International Edition* **53**,

- 1334-1337
62. Guo, Y. Y., Li, H., Zhou, Z. X., Mae, X. M., Tang, Y., Chen, X., Jiang, X. H., Liu, Y., Jiang, H., and Li, Y. Q. (2015) Identification and Biosynthetic Characterization of Natural Aromatic Azoxy Products from *Streptomyces chattanoogensis* L110. *Organic Letters* **17**, 6114-6117
 63. Le Goff, G., and Ouazzani, J. (2014) Natural hydrazine-containing compounds: Biosynthesis, isolation, biological activities and synthesis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **22**, 6529-6544
 64. Sugai, Y., Katsuyama, Y., and Ohnishi, Y. (2016) A nitrous acid biosynthetic pathway for diazo group formation in bacteria. *Nature Chemical Biology* **12**, 73-+
 65. Huang, Z. D., Wang, K. K. A., and van der Donk, W. A. (2016) New insights into the biosynthesis of fosfazinomycin. *Chemical Science* **7**, 5219-5223
 66. Parry, R. J., and Li, W. Y. (1997) Purification and characterization of isobutylamine N-hydroxylase from the valanimycin producer *Streptomyces viridifaciens* MG456-hF10. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **339**, 47-54
 67. Parry, R. J., Li, W. Y., and Cooper, H. N. (1997) Cloning, analysis, and overexpression of the gene encoding isobutylamine N-hydroxylase from the valanimycin producer, *Streptomyces viridifaciens*. *Journal of Bacteriology* **179**, 409-416
 68. Parry, R. J., and Li, W. Y. (1997) An NADPH:FAD oxidoreductase from the valanimycin producer, *Streptomyces viridifaciens* - Cloning, analysis, and overexpression. *Journal of Biological Chemistry* **272**, 23303-23311
 69. Garg, R. P., Gonzalez, J. M., and Parry, R. J. (2006) Biochemical characterization of VlmL, a seryl-tRNA synthetase encoded by the valanimycin biosynthetic gene cluster. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 26785-26791
 70. Garg, R. P., Qian, X. L. L., Alemany, L. B., Moran, S., and Parry, R. J. (2008) Investigations of valanimycin biosynthesis: Elucidation of the role of seryl-tRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 6543-6547
 71. Garg, R. P., Alemany, L. B., Moran, S., and Parry, R. J. (2009) Identification, Characterization, and Bioconversion of a New Intermediate in Valanimycin Biosynthesis. *Journal of the American Chemical Society* **131**, 9608-9609
 72. Winkler, R., and Hertweck, C. (2005) Sequential enzymatic oxidation of aminoarenes to nitroarenes via hydroxylamines. *Angewandte Chemie-International Edition* **44**, 4083-4087
 73. Omura, S., Matsuzaki, K., Fujimoto, T., Kosuge, K., Furuya, T., Fujita, S., and Nakagawa, A. (1991) STRUCTURE OF LACTACYSTIN, A NEW MICROBIAL

- METABOLITE WHICH INDUCES DIFFERENTIATION OF NEUROBLASTOMA-CELLS. *Journal of Antibiotics* **44**, 117-118
74. Fukumoto, A., Kim, Y. P., Matsumoto, A., Takahashi, Y., Shiomi, K., Tomoda, H., and Omura, S. (2008) Cyslabdan, a new potentiator of imipenem activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, produced by *Streptomyces* sp K04-0144 - I. Taxonomy, fermentation, isolation and structural elucidation. *Journal of Antibiotics* **61**, 1-6
 75. Carney, J. R., Hong, S. T., and Gould, S. J. (1997) Seongomycin: A new sulfur-containing benzo b fluorene derived from genes clustered with those for kinamycin biosynthesis. *Tetrahedron Letters* **38**, 3139-3142
 76. Woo, C. M., Gholap, S. L., and Herzon, S. B. (2013) Insights into Lomaiviticin Biosynthesis. Isolation and Structure Elucidation of (-)-Homoseongomycin. *Journal of Natural Products* **76**, 1238-1241
 77. Ikeda, H., Shin-ya, K., Nagamitsu, T., and Tomoda, H. (2016) Biosynthesis of mercapturic acid derivative of the labdane-type diterpene, cyslabdan that potentiates imipenem activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: cyslabdan is generated by mycothiol-mediated xenobiotic detoxification. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* **43**, 325-342
 78. Newton, G. L., Buchmeier, N., and Fahey, R. C. (2008) Biosynthesis and functions of mycothiol, the unique protective thiol of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **72**, 471-+
 79. Jothivasan, V. K., and Hamilton, C. J. (2008) Mycothiol: synthesis, biosynthesis and biological functions of the major low molecular weight thiol in actinomycetes. *Natural Product Reports* **25**, 1091-1117
 80. Sakuda, S., Zhou, Z. Y., and Yamada, Y. (1994) STRUCTURE OF A NOVEL DISULFIDE OF 2-(N-ACETYLCYSTEINYL)AMIDO-2-DEOXY-ALPHA-D-GLUCOPYRANOSYL-MY O-INOSITOL PRODUCED BY STREPTOMYCES SP. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **58**, 1347-1348
 81. Nicholas, G. M., Kovac, P., and Bewley, C. A. (2002) Total synthesis and proof of structure of mycothiol bimane. *Journal of the American Chemical Society* **124**, 3492-3493

謝辞

本研究を行うにあたり、大変多くの方々からのご指導、ご支援をいただきました。厚く御礼申し上げます。

素晴らしい研究環境、研究テーマを与えてくださり、また研究の全般において多大なご指導、ご助言を下さいました東京大学生物生産工学研究センター細胞機能工学研究室の西山 真 教授に、厚く御礼申し上げます。また、放線菌の取り扱いその他実験における貴重なご助言を下さいました同研究室の葛山 智久 准教授に深く御礼申し上げます。また、同研究室の富田 武郎 助教には、実験を丁寧に教えていただき、数多くのご指導、ご助言をいただきました。深く感謝いたします。そして、同研究室の皆様にもご指導、ご助言をいただきました。この場を借りて深く御礼申し上げます。

東京大学生物生産工学研究センター微生物機能代謝工学研究室の古園 さおり 特任准教授には実験について多くのご助言を頂きました。深く感謝申し上げます。また同研究室の吉田 彩子 特任助教には研究に関するご助言とともに細胞機能工学研究室の先輩として研究室生活全般における多くのご助言を頂きました。深く感謝申し上げます。

独立行政法人産業技術総合研究所バイオメディシナル情報研究センターの新家一男 先生にはゲノムサンプルのライブラリーや多数の菌株を分与していただきました。この場をお借りして心より感謝申し上げます。

東京農業大学生物資源ゲノム解析センターの吉川博文 教授、志波 優 先生、兼崎 友 先生には次世代シーケンサーにより、多数の菌株のドラフトゲノムシークエンス解析を行っていただきました。この場をお借りして、深く感謝申し上げます。

最後に、精神面・経済面で大きな支えとなってくれた家族に感謝いたします。

皆様、ありがとうございました。

平成 28 年 12 月 15 日